



**João Pedro de
Almeida Coutinho**

**Estudo comparativo de atuadores capacitivos para
implantes ativos.**



**João Pedro de
Almeida Coutinho**

**Estudo comparativo de atuadores capacitivos para
implantes ativos.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Marco Paulo Soares dos Santos, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e do Professor Doutor António Manuel de Amaral Monteiro Ramos, Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro dos projetos
UID/EMS/00481/2013-FCT e CENTRO-
01-0145-FEDER-022083

o júri

Presidente

Prof. Doutor Jorge Augusto Fernandes Ferreira
Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Raul Manuel Pereira Morais dos Santos
Professor Associado com Agregação da Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Doutor Marco Paulo Soares dos Santos
Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço desde já aos meus orientadores, Professor Doutor Marco Santos e Professor Doutor António Ramos, pelo apoio e conselhos dados durante este trabalho e se mostrarem sempre disponíveis e prontos a ajudar em tudo o que fosse possível.

Aos meus pais por me apoiarem sempre ao longos destes anos, por todos os sacrifícios que fizeram e me darem sempre na cabeça para cumprir todos os meus objetivos.

Ao meu irmão, por me aturar e me ter emprestado o computador.

A toda a minha família por me dar sempre forças e todo o apoio em todos os momentos e se mostrar sempre disponível.

À Maria Gomes por ao longo destes anos me ter incentivado sempre, ajudado em tudo o que pode e tornar tudo muito mais fácil, sempre com um sorriso. Sem ti ainda tinha mais uns 5 anos até acabar o curso.

Finalmente reconhecer o apoio de todos os meus amigos que me acompanharam durante este percurso e me acompanharão sempre.

A todos, muito obrigado!

Palavras-chave

Implante instrumentado; implante ativo; osseointegração; estimulação capacitiva; atuadores capacitivos

Resumo

Para o desenvolvimento de implantes instrumentados ativos, dotados de capacidade para controlar a sua integração com os tecidos ósseos circundantes, é necessário analisar o comportamento de sistemas de atuação terapêutica. Estudos anteriores observaram o potencial osteogênico da estimulação eletromagnética e, em particular, usando estimuladores capacitivos. O objetivo deste estudo é analisar comparativamente as características dos estímulos aplicados a meios celulares osteoblásticos, em estados de alta e baixa confluência, por vários sistemas de atuação capacitiva: uma configuração em paralela e quatro em co-superfície (padrão listado, interdigitada 1.0, interdigitada 2.0 e circular). Para tal utilizou-se o software Comsol, onde através da física “magnetic and electric fields” foi possível conduzir a simulação do estímulo aplicado ao meio celular. A excitação aplicada aos eletrodos tratou-se de um sinal sinusoidal, de amplitude 10 V e frequências de 14 Hz e 60 kHz. Foram simulados os modelos reais, referentes a sistemas testados experimentalmente in vitro e modelos simplificados, compostos apenas por 3 eletrodos.

Concluiu-se que: (1) para todas as configurações testadas se atingiram magnitudes de campos elétricos e magnéticos capazes de potenciar as três fases de maturação dos osteoblastos (proliferação, diferenciação e mineralização) quando comparado com outros estudos in vitro; (2) O estado de confluência não altera significativamente os estímulos elétricos e magnéticos aplicados ao meio celular; (3) a magnitude dos estímulos varia proporcionalmente com a amplitude da excitação aplicada aos eletrodos; (4) Recorrendo a altas frequências o campo elétrico não se anula sob os eletrodos-ânodo, exceto para configurações com eletrodos de espessura reduzida; (5) Os valores máximos de campo magnético encontram-se sempre entre as interfaces dos eletrodos e se suficientemente próximos entre as interfaces eletrodo-placa de Petri; (6) Com a diminuição da espessura verifica-se um padrão mais definindo do campo magnético nas interfaces dos eletrodos-cátodo e eletrodos-ânodo; (7) A replicabilidade dos campos elétricos e magnéticos é possível para estímulos de baixa frequência, para altas frequência apenas com os eletrodos de espessura reduzida tal se verifica, nos restantes ocorrem fenómenos nas altas frequências que impedem o uso de modelos simplificados para a análise da dinâmica eletromagnética.

Ainda não é possível afirmar a melhor configuração de eletrodos a adotar mas com este estudo, realizando futuros ensaios in vitro e cruzando a resposta biológica com tais dados será possível concluir com mais precisão quais os melhores parâmetros e configurações que poderão vir a servir de atuadores capacitivos num implante instrumentado ativo.

Keywords

Instrumented implant; active implant; osseointegration; capacitive stimulation; capacitive actuators

Abstract

For the development of active instrumented implants equipped with the ability to control their integration with the surrounding bone tissues, it is necessary to analyze the behavior of therapeutic actuation systems. Previous studies have observed the osteogenic potential of electromagnetic stimulation using capacitive stimulators. The purpose of this study is to analyze the characteristics of the stimuli applied to osteoblastic cellular media, in high and low confluence states, by several capacitive actuation systems: a parallel and four with a cosurfaced configuration (listed pattern, interdigitated 1.0, interdigitated 2.0 and circular). For this purpose, the Comsol software was used, where through the physics "magnetic and electric fields" it was possible to conduct simulation of the stimulus applied to the cellular medium. The excitation applied to the electrodes was a sinusoidal signal, amplitude 10 V and frequencies of 14 Hz and 60 kHz. A real model (like the experimentally tested *in vitro* systems) and a simplified one (composed only by 3 electrodes) were simulated.

The outcomes were: (1) for all tested configurations, it was possible to reach magnitudes of electric and magnetic fields capable of enhancing the three stages of osteoblasts maturation (proliferation, differentiation and mineralization) when compared to other *in vitro* studies; (2) The state of confluence does not significantly alter the electrical and magnetic stimuli applied to the cellular environment; (3) the magnitude of the stimuli varies proportionally with the amplitude of the excitation applied to the electrodes; (4) Using high frequencies, the electric field does not cancel under the anode-electrodes, which is an exception for configurations with reduced-thickness electrodes; (5) Maximum magnetic field values are always between the electrode interfaces and between the Petri plate-electrodes interfaces, if they are close enough; (6) With the decrease of the thickness, a more defining pattern of the magnetic field is verified in the interfaces of the electrodes-cathode and electrodes-anode; (7) The replicability of the electric and magnetic fields is possible for low frequency stimuli, for high frequency only with the low thickness electrodes that happens, in the others occur phenomena in the high frequencies that prevent the use of simplified models for the analysis of the dynamics electromagnetic fields.

It is not yet possible claim what is the best configuration of electrodes to be adopted, but with this study and by conducting future *in vitro* experiments and crossing the biological response with such data, it will be possible to, affirm, more precisely, which are the best parameters and configurations that could serve as capacitive actuators for active instrumented implants.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Problema	1
1.2. Solução	2
1.3. Objetivos	4
1.4. Guia da Tese	5
2. Estado de Arte	7
2.1. Estimulação elétrica/magnética	7
2.2. Introdução	7
2.3. Resposta à estimulação celular CC	8
2.3.1. In Vitro	8
2.3.2. Scaffolds	10
2.3.3. In vivo	10
2.4. Análise crítica	12
3. Modelos Computacionais	13
3.1. Configuração dos sistemas capacitivos	13
3.1.1. Co-superfície listrado	13
3.1.2. Co-superfície Interdigitada 1.0	14
3.1.3. Co-superfície Interdigitada 2.0	14
3.1.4. Co-superfície Circular	15
3.1.5. Configuração Paralela	16
3.2. Modelos completos	16
3.3. Modelos Simplificados	18
4. Métodos	21
4.1. Softwares	21
4.1.1. SolidWorks 2016	21
4.1.2. COMSOL Multiphysics® versão 5.2	22
4.2. Estudo de convergência	25
4.2.1. Convergência das malhas	25
4.2.2. Convergência da envolvente de ar	27
5. Análise de Resultados	31
5.1. Influência do estado de confluência	31
5.2. Influência da configuração do estimulador	34
5.2.1. Configuração em co-superfície listrado	34
5.2.2. Configuração em co-superfície interdigitado 1.0	36
5.2.3. Configuração em co-superfície interdigitado 2.0	38

5.2.4.	Configuração em co-superfície circular.....	40
5.2.5.	Configuração paralela	42
5.3.	Análise comparativa entre configurações.....	44
5.4.	Influência da espessura das configurações	47
5.5.	Influência da excitação aos elétrodos	51
5.6.	Validação dos modelos simplificados.....	52
6.	Discussão e conclusões	53
	Bibliografia	55
	ANEXOS	61
A.	Parâmetros mais importantes da estimulação e condições do meio a estimular sintetizadas em tabelas.....	63
B.	Propriedades dos elementos e simulação para os diferentes tipos de malhas.....	77
C.	Correlação das dinâmicas estímulo exterior aplicado e os campos elétricos e magnéticos no meio celular	81
D.	Campos elétricos e magnéticos no meio celular para as diferentes configurações e frequências quando se varia a amplitude do potencial aplicado	83
E.	Validação dos modelos simplificados.....	93

Índice de Figuras

Figura 1 - Métodos de estimulação AC (acoplamento capacitivo) com elétrodos em paralelo [3].	2
Figura 2 - Conceito do estimulador capacitivo em co-superfície com padrão listrado [3].	3
Figura 3 – Esquema da estimulação com a estrutura planar in vitro de células MC3T3: a. Estado de baixa confluência; b. Estado de confluência [3].	3
Figura 4 - Representação gráfica dos estímulos elétricos: a. frequência de 14Hz; b. frequência de 60kHz.	4
Figura 5 - Exemplos de configuração dos elétrodos numa só superfície (direita: co-superfície padrão listrado [3], esquerda: interdigitado [35]).	9
Figura 6 - Estimulação elétrica capacitiva in vivo numa fratura [40].	11
Figura 7 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão listrado.	13
Figura 8 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão interdigitado 1.0.	14
Figura 9 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão interdigitado 2.0.	15
Figura 10 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície circular.	15
Figura 11 - Disposição dos elétrodos na configuração paralela.	16
Figura 12 – Domínios do modelo completo do estimulador capacitivo em co-superfície.	17
Figura 13 - Domínios do modelo completo do estimulador de configuração paralela.	17
Figura 14 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície listrada.	19
Figura 15 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.	19
Figura 16 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.	19
Figura 17 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície circular.	20
Figura 18 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração paralela.	20
Figura 19 – Sistema de coordenadas criado no SolidWorks.	21
Figura 20 – Excitação aplicada aos elétrodos de cada uma das configurações: a. Frequência de 14 Hz; b. Frequência de 60 kHz.	22
Figura 21 - Elétrodos-ânodo (a azul) e elétrodos-cátodo (a cinzento) nas configurações em co-superfície: a. Modelos reais; b. Modelos simplificados.	24
Figura 22 - Elétrodos-ânodo (a azul) e elétrodos-cátodo (a cinzento) na configuração paralela.	24
Figura 23 - Aquisição dos resultados da simulação num plano e linha transversal aos elétrodos	25
Figura 24 - CE no meio celular ao longo da linha ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0.51$ mm) para as diferentes malhas criadas, com uma excitação BF.	27
Figura 25 - Representação dos vários volumes de ar para o estudo de convergência da envolvente: a. 1.11 cm^3 ; b. 2.98 cm^3 ; c. 6.11 cm^3 ; d. 21.34 cm^3 .	28
Figura 26 - Valores do campo elétrico no meio celular para cada envolvente de ar para baixas frequências.	28
Figura 27 - Valores do campo elétrico no meio celular para cada envolvente de ar para altas frequências.	29

Figura 28 – Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície listrado (bc – baixa confluência; tc – total confluência).....	32
Figura 29 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície interdigitado 1.0 (bc – baixa confluência; tc – total confluência).	32
Figura 30 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície interdigitado 2.0 (bc – baixa confluência; tc – total confluência).	33
Figura 31 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície circular (bc – baixa confluência; tc – total confluência).	33
Figura 32 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração paralela (bc – baixa confluência; tc – total confluência).	34
Figura 33 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado para BF e AF.....	35
Figura 34 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado para BF e AF.....	35
Figura 35 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado aplicando a excitação: a. CE para BF; b. CE para AF; c. CM para BF; d. CE para AF.	36
Figura 36 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 1.0 para AF e BF.	37
Figura 37 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 1.0 para BF e BF.	37
Figura 38 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 1.0 aplicando a excitação: a. CE para BF; b. CE para AF; c. CM para BF; d. CM para AF.	38
Figura 39 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 2.0 para BF e AF.	39
Figura 40 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 2.0 para BF e AF.	39
Figura 41 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 2.0 aplicando a excitação: a. CE para BF; b. CE para AF; c. CM para BF; d. CM para AF.	40
Figura 42 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,6]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície circular para BF e AF.	41
Figura 43 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,6]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície circular para BF e AF.	41
Figura 44 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície circular aplicando a excitação: a. CE para BF; b. CE para AF; c. CM para BF; d. CM para AF.	42
Figura 45 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração paralela para BF e AF.....	43
Figura 46 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,5,6,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração paralela para BF e AF.....	43
Figura 47 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração paralela aplicando a excitação: a. CE para BF; b. CE para AF; c. CM para BF; d. CM para AF.	44
Figura 48 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação BF.	45
Figura 49 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação AF.	46
Figura 50 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação BF.....	46
Figura 51 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação AF.....	47

Figura 52 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação BF.....	48
Figura 53 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação AF.	48
Figura 54 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação BF.....	49
Figura 55 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação AF.	49
Figura 56 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície padrão listrado aplicando a excitação: a. CM para BF; b. CM para AF.....	50
Figura 57 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 1.5 aplicando a excitação: a. CM para BF; b. CM para AF.	50
Figura 58 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície circular aplicando a excitação: a. CM para BF; b. CM para AF.	50
Figura 59 - Variação do máximo do CE no meio celular em função da amplitude da excitação aplicada aos elétrodo ($x= \max.$ CE, $y= 0$ mm, $z=0,51$ mm).	51
Figura 60 - Variação da media do CM no meio celular em função da amplitude da excitação aplicada aos elétrodo ($y= 0$ mm, $z=0,51$ mm).	52
Figura 61 – Dinâmicas do estímulo exterior BF e CE no meio celular ($x=0,15$ mm; $y=0$ mm; $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície padrão listrado.....	81
Figura 62 - Dinâmicas do estímulo exterior BF e CM no meio celular ($x=0,15$ mm; $y=0$ mm; $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície padrão listrado.....	81
Figura 63 - Dinâmicas do estímulo exterior AF e CE no meio celular ($x=0,15$ mm; $y=0$ mm; $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície padrão listrado.....	82
Figura 64 - Dinâmicas do estímulo exterior AF e CM no meio celular ($x=0,15$ mm; $y=0$ mm; $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície padrão listrado.....	82
Figura 65 – CE consoante a amplitude do potencial aplicado para BF (Co-superfície padrão listrado).	83
Figura 66 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado para AF (Co-superfície padrão listrado).	83
Figura 67 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado para BF (Co-superfície padrão listrado).	84
Figura 68 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado para AF (Co-superfície padrão listrado).	84
Figura 69 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 1.0).	85
Figura 70 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 1.0).	85
Figura 71 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 1.0).	86
Figura 72 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 1.0).	86
Figura 73 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 2.0).	87
Figura 74 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 2.0).	87
Figura 75 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 2.0).	88

Figura 76 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 2.0).	88
Figura 77 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície circular).....	89
Figura 78 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície circular). ...	89
Figura 79 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície circular). ..	90
Figura 80 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície circular). ..	90
Figura 81 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Paralela).....	91
Figura 82 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Paralela).....	91
Figura 83 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Paralela).	92
Figura 84 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Paralela).	92
Figura 85 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície listrado.	93
Figura 86 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície listrado.	93
Figura 87 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.	94
Figura 88 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.	94
Figura 89 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.	95
Figura 90 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.	95
Figura 91 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular.....	96
Figura 92 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular.....	96
Figura 93 - Comparação do CE para BF no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração paralela.	97
Figura 94 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração paralela.....	97
Figura 95 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície padrão listado 2.0 (espessura reduzida).	98
Figura 96 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície padrão listado 2.0 (espessura reduzida).	98
Figura 97 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular 2.0 (espessura reduzida).	99

Figura 98 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular 2.0 (espessura reduzida).	99
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades elétricas e magnéticas dos domínios dos modelos completos e simplificados, e resumo das suas propriedades dimensionais [3].	18
Tabela 2 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares com elétrodos em paralelo.	63
Tabela 3 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares com elétrodos em paralelo.	64
Tabela 4 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em células estaminais com elétrodos em paralelo.	65
Tabela 5 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em culturas primárias com elétrodos em paralelo.	66
Tabela 6 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em culturas primárias com elétrodos em paralelo.	67
Tabela 7 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares e células estaminais para configurações de elétrodos não paralelas.	68
Tabela 8 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em scaffolds.	69
Tabela 9 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em scaffolds.	70
Tabela 10 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em pacientes humanos.	71
Tabela 11 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em pacientes humanos.	72
Tabela 12 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.	73
Tabela 13 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.	74
Tabela 14 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.	75
Tabela 15 - Propriedades da malha "Coarse".	77
Tabela 16 - Propriedades da malha "Normal".	77
Tabela 17 - Propriedades da malha "Fine".	77
Tabela 18 - Propriedades da malha "Costum_1".	78
Tabela 19 - Propriedades da malha "Costum_2".	78
Tabela 20 - Propriedades da malha "Costum_3".	78
Tabela 21 - Propriedades da malha "Costum_4".	79

Lista de Acrónimos

CAD	<i>Desenho assistido por computador</i>
FEM	<i>Método dos elementos finitos</i>
EE	<i>Estimulação elétrica</i>
AI	<i>Acoplamento Indutivo</i>
DC	<i>Acoplamento com Corrente Direta</i>
AC	<i>Acoplamento Capacitivo</i>
CE	<i>Campo elétrico</i>
CM	<i>Campo magnético</i>
CEM	<i>Campo eletromagnético</i>
BF	<i>Baixa frequência – 14 Hz</i>
AF	<i>Alta frequência – 60 kHz</i>
CsPL	<i>Configuração em co-superfície padrão listado</i>
CsPL 2.0	<i>Configuração em co-superfície padrão listado 2.0 (espessura reduzida)</i>
CsINT 1.0	<i>Configuração em co-superfície interdigitada 1.0</i>
CsINT 1.5	<i>Configuração em co-superfície interdigitada 1.5 (espessura reduzida)</i>
CsINT 2.0	<i>Configuração em co-superfície interdigitada 2.0</i>
CsCIR	<i>Configuração em co-superfície circular</i>
CsCIR 2.0	<i>Configuração em co-superfície circular 2.0 (espessura reduzida)</i>
PAR	<i>Configuração em paralelo</i>
ALPa	<i>Atividade de fosfatase alcalina</i>
ALPe	<i>Expressão de fosfatase alcalina</i>
BMP	<i>Proteína morfogenética do osso</i>
BSP	<i>Sialoproteína óssea</i>

Ca²⁺	<i>Cálcio ionizado</i>
Nr. Cel..	<i>Contagem direta das células</i>
Col-I	<i>Colagénio do tipo I</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
EA	<i>Ensaio de exclusão de azul trypan</i>
IA	<i>Quantificação de ADN exogéneo</i>
MetB	<i>Ensaio de viabilidade metabólica celular</i>
MM	<i>Mineralização da matriz</i>
OC	<i>Osteocalcina</i>
ON	<i>Osteonectina</i>
OPN	<i>Osteoponina</i>
SP	<i>Síntese de proteínas</i>

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Problema

A osteoartrite é a causa mais comum para a artroplastia primária da anca e do joelho [1]–[3]. A sua prevalência é de aproximadamente 4% da global incapacidade física [1]–[3]. Estudos recentes estimam aumentos consideráveis no número de artroplastias nas próximas décadas [3]–[5]. Embora este procedimento cirúrgico seja considerado de sucesso, as taxas de revisão podem ultrapassar os 10%, e estas são significativamente mais complexas e invasivas [3], [6], [7]. Além disso, o número de pacientes com idade inferior a 65 anos e/ou ativos também irá muito provavelmente aumentar. Atualmente, estes pacientes representam 30% do número total, mas podem ultrapassar os 50% na próxima década [8]–[10]. Certamente que o aumento significativo das fixações não cimentadas que se observa globalmente também se deva a este fato [11].

Estes dados evidenciam a necessidade de se projetar implantes ósseos que minimizem possíveis falhas ao longo da vida do paciente. Uma efetiva ósseo-integração do implante é fundamental para tal objetivo, mas tem-se observado que a perda de tecido ósseo circundante é um dos fenómenos mais frequentes para a revisão [3], [12], [13]. As taxas de revisão devido à perda de massa óssea pelo efeito stress-shielding podem exceder os 50%, o que implica que o descolamento asséptico é uma das principais causas indicadas para a artroplastia de anca e joelho [5], [14]. Várias metodologias já foram propostas para responder a este problema. Como métodos para melhorar a aderência osso-implante, realça-se o uso de geometrias personalizadas, de texturas de superfície definidas à nano-escala, de superfícies porosas, e do uso de materiais biocompatíveis biofuncionais [12], [13], [15]–[17]. Contudo, apesar de tais metodologias melhorarem a ligação do osso ao implante, melhores desempenhos podem ser alcançados através de modificações químicas e bioquímicas das superfícies dos implantes [13]. Este conceito tem sido familiarizado na incorporação de sistemas de atuação baseados em biomateriais (por exemplo, compósitos de hidroxiapatite), libertação de drogas e biomoléculas [13]. Contudo, a controlabilidade de tais sistemas é reduzida pois: (1) o seu comportamento não pode ser alterado após a sua inserção; (2) a sua dinâmica terapêutica não considera os estados bioquímicos e biomecânicos da interface; (3) a libertação de biomoléculas e/ou drogas não pode ser personalizada; (4) o design de tais sistemas pode implicar grande complexidade, principalmente se inclui revestimentos multifuncionais [3].

O conceito de Implante Instrumentado Ativo começa a ser apresentado como o mais promissor para o desenvolvimento da futura geração de implantes ósseos [3]. Sendo dotados por sistemas internos de atuação biofísica, monitorização e comunicação, poderão ter a capacidade de controlar a sua integração com os tecidos ósseos circundantes. Permitem ainda que médicos especialistas possam controlar as suas operações de monitorização e atuação, assegurando um funcionamento personalizado [3]. Para a real implementação destes implantes

inovadores há ainda a necessidade de se analisar o comportamento de sistemas de atuação terapêutica baseada em estimulação eletromagnética [3].

1.2. Solução

Soares do Santos *et al.* [3] propôs um novo sistema de atuação capacitivo para implantes instrumentados. Este consiste numa configuração capacitiva em co-superfície com padrão listrado [3]. Embora a estrutura capacitiva de uso generalizado tem configuração paralela (Figura 1), esta nova proposta consiste em colocar todos os elétrodos na mesma superfície (Figura 2). Foi assim desenvolvido para cumprir os seguintes requisitos:

- Aplicar uma estimulação controlada, através da definição de várias variáveis, como a forma de onda, amplitude, frequência, periodicidade e tempo em exposição;
- Permitir que os estímulos possam ser aplicados a regiões-alvo do tecido ósseo;
- Programar uma estimulação que possa ser personalizável ao longo do tempo;
- Assegurar que a estimulação se mantenha funcional durante toda a vida do paciente;
- Capaz de aplicar estímulos terapêuticos dependentes de estados de ósseo-integração.

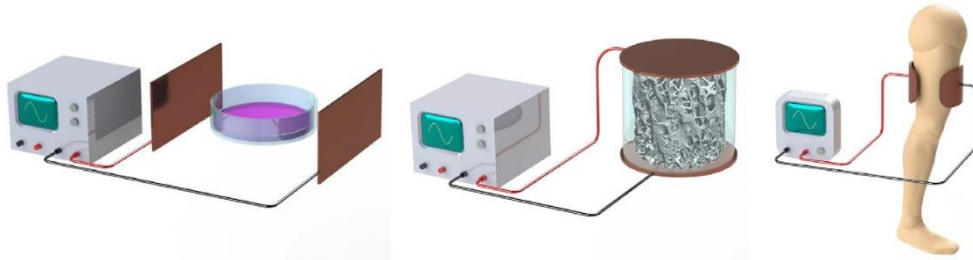


Figura 1 - Métodos de estimulação AC (acoplamento capacitivo) com elétrodos em paralelo [3].

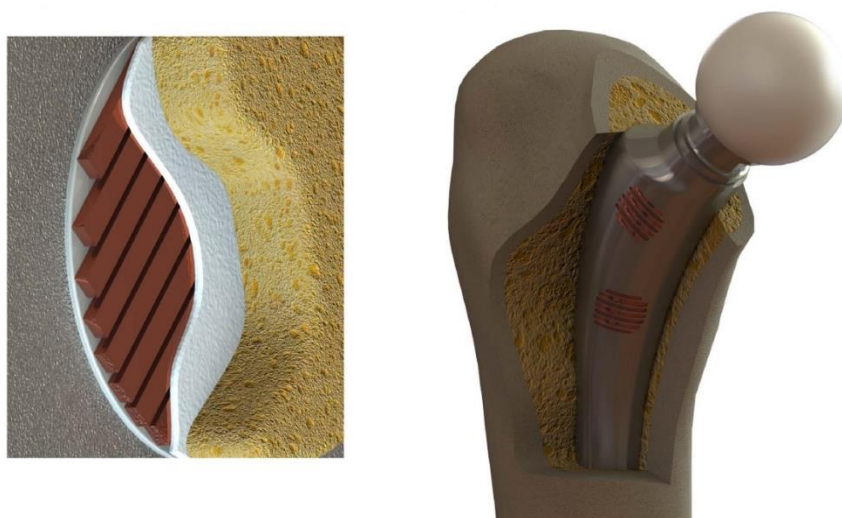


Figura 2 - Conceito do estimulador capacitivo em co-superfície com padrão listrado [3].

No estudo conduzido por Soares dos Santos et al. [3] foi analisada a potencialidade da estrutura planar in vitro. Doze elétrodos foram posicionados de forma alternada (esquema de ligação ânodo-cátodo) sobre um substrato de suporte, e acima destes foi posicionada uma placa de Petri com o meio celular (Figura 3). Para a caracterização do campo elétrico (CE) produzido por tal configuração, desenvolveram e simularam um modelo computacional baseado em elementos finitos, considerando o meio celular apenas com duas fases homogêneas e dependentes do estado de confluência:

- Estado de baixa confluência - uma camada de células MC3T3 com 0,01 mm de espessura aderente ao fundo de poliestireno da placa de Petri, a qual foi coberta por um meio fisiológico de 1 mm (Figura 3a);
- Estado de confluência: em tudo idêntica à de baixo estado de confluência, mas com uma cultura de células com 0,02 mm de espessura (Figura 3b);

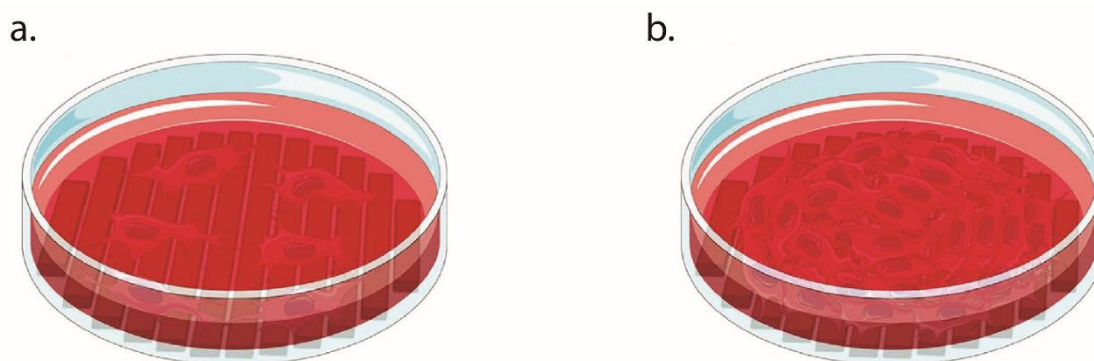


Figura 3 – Esquema da estimulação com a estrutura planar in vitro de células MC3T3: **a.** Estado de baixa confluência; **b.** Estado de confluência [3].

Puderam, assim, identificar a dinâmica e distribuição do campo elétrico ao longo do meio celular ao se aplicar uma excitação externa de voltagem elétrica aos elétrodos definido como $K_{ex} \cdot (1 - \cos \omega \cdot t)$ [V], onde ω é a frequência angular, e de acordo com os diferentes parâmetros de K_{ex} :

- BF: $K_{ex} = 5$ [V] (10 V pico a pico) e frequência de 14 Hz (Figura 4a);
- AF: $K_{ex} = 5$ [V] (10 V pico a pico) e frequência de 60 kHz (Figura 4b).

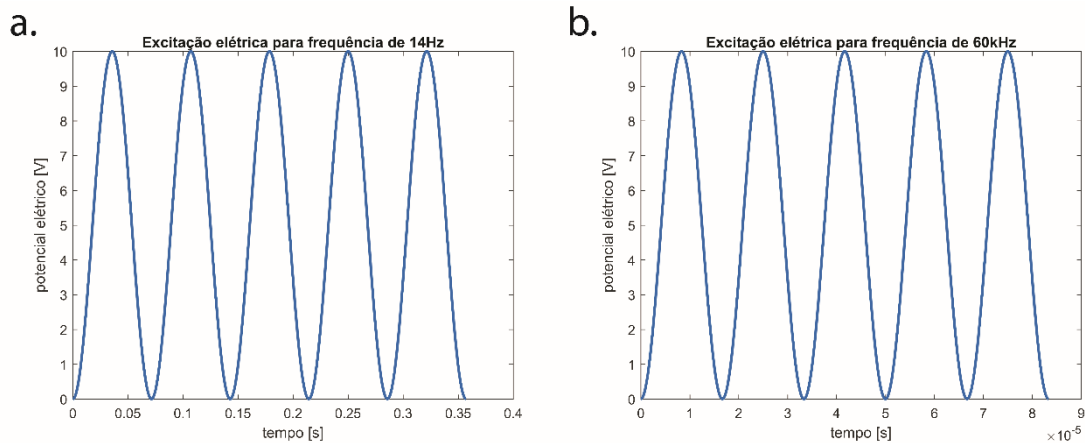


Figura 4 - Representação gráfica dos estímulos elétricos: **a.** frequência de 14Hz; **b.** frequência de 60kHz.

Embora tivessem sido os primeiros investigadores a proporem um sistema de estimulação com grande potencial para ser incorporado em implantes ósseos ativos instrumentados, apenas analisaram uma configuração de atuadores capacitivos, a saber em co-superfície com padrão listrado, não apresentaram o estímulo magnético por este produzido e não estudaram a influência da espessura dos elétrodos no estímulo eletromagnético.

1.3. Objetivos

O principal objetivo desta dissertação é analisar comparativamente as características dos estímulos aplicados a meios celulares osteoblásticos em estados de alta e baixa confluência por vários sistemas de atuação capacitiva, de acordo com as seguintes configurações (ver o capítulo 3 para uma descrição mais detalhada):

- Paralela: 2 discos circulares colocados em paralelo com o dielétrico constituído pela placa de Petri e meio celular. Sendo esta a configuração capacitiva comumente utilizada, inclusivamente para estimulação celular, é importante analisar o seu desempenho comparativo.
- Co-superfície em padrão listrado: composto por 12 elétrodos, como proposto por Soares dos Santos *et al.* [3];
- Co-superfície em padrão interdigitado 1.0: dois elétrodos com várias listras entrelaçadas entre si;

- Co-superfície em padrão interdigitado 2.0: Configuração semelhante ao interdigitado 1.0, mas com dimensões construtivas iguais às de um estimulador que está atualmente a ser testado experimentalmente num estudo *in vitro* (realizado por investigadores dos grupos de investigação TEMA e IBIMED). Pretende-se assim identificar quais os estímulos elétricos e magnéticos osteogénicos que esta configuração é capaz de prover;
- Co-superfície em padrão circular: 7 listras circulares de elétrodos intercalados entre si.

Para isso, inicialmente será analisado o estado de arte relativo aos sistemas de atuação capacitiva para estimulação óssea *in vitro* e *in vivo*, onde se identificarão as propriedades biofísicas dos estímulos osteogénicos que devem ser consideradas para o estudo comparativo (capítulo 2). Segue-se a descrição do desenvolvimento dos vários modelos FEM do aparato composto pelos sistemas de atuação e estrutura celular a estimular (capítulo 3 e 4). O capítulo 5 apresenta os resultados da simulação e análise comparativa do campo elétrico e campo magnético para baixas (BF) e altas (AF) frequências ao longo dos diferentes meios celulares quando se aplicam aos elétrodos excitações de voltagem iguais a $K_{ex} \cdot (1 - \cos w \cdot t)$ [V], com K_{ex} entre 0 e 5 [V]. Uma discussão sobre os resultados obtidos será realizada, o qual precederá a conclusão do trabalho (capítulo 6).

1.4. Guia da Tese

Esta dissertação está organizada em 5 capítulos. Após esta introdução, segue-se:

- Capítulo 2: Revisão da literatura e breve análise crítica;
- Capítulo 3: Descrição dos modelos computacionais que foram desenvolvidos e simulados de acordo com as 4 configurações de sistemas capacitivos em co-superfície consideradas;
- Capítulo 4: Descrição do método usado para se simular e validar os modelos descritos no Capítulo 3;
- Capítulo 5: Análise comparativa dos campos elétricos e magnéticos aplicados pelos vários estimuladores às culturas celulares osteoblásticas;
- Capítulo 6: Discussão e conclusões deste estudo.

Capítulo 2

2. Estado de Arte

2.1. Estimulação elétrica/magnética

A estimulação elétrica (EE) é uma metodologia eficaz para potenciar a regeneração óssea. Já foram propostos três métodos para implementar esta estimulação: por Corrente Direta (DC), Acoplamento Capacitivo (AC) e Acoplamento Indutivo (AI) [18]. O primeiro destes métodos é método invasivo, os restantes não. Neste trabalho apenas serão analisados e estudados sistemas que utilizam o método AC na estimulação. Os sistemas AC são compostos por dois eléktrodo não corrosivos que armazenam cargas opostas, em que pelo menos um deles não está em contato óhmico com o meio celular [19]–[21]. Usualmente, o meio celular e a placa de Petri fazem parte do seu dielétrico [3], [19]–[21]. O estímulo é elétrico ou eletromagnético se a excitação for constante ou variável no tempo, respetivamente.

2.2. Introdução

Para identificar as características dos estímulos elétricos e/ou magnéticos com maior potencialidade osteogénica na remodelação óssea foram realizados vários estudos em culturas celulares (*in vitro* e *scaffolds*) e em seres vivos (*in vivo*). Os estudos *in vitro* podem ser categorizados segundo as três culturas celulares seguintes: culturas com linhas celulares; culturas com células estaminais; e culturas com células primárias. Para uma mais completa análise sistemática de tais estudos, os parâmetros mais relevantes da estimulação exercida, assim como as condições do meio a estimular, foram sintetizados nas Tabela 1 à 15 do anexo A. Aí pode-se observar o tipo de cultura utilizada ou aparato de estimulação, assim como o seu estado de confluência (em testes *in vitro*), o tipo de excitação aplicado aos eléktrodo, a frequência e a periodicidade e intensidade dos campos elétricos, a densidade da corrente e o tempo de exposição à estimulação.

Nos estudos *in vitro*, os resultados osteogénicos foram analisados segundo as três categorias de maturação de osteoblastos:

- Proliferação: Esta fase é geralmente avaliada pela contagem de células, ensaios de exclusão de azul trypan, ensaios de viabilidade celular metabólica ('MetB'), quantificação do conteúdo de ADN ('ADN'), quantificação de ADN exogénico ('IA') e finalmente a síntese de proteínas ('SP') [22];
- Diferenciação: Imediatamente a seguir à confluência celular, é caracterizada pela formação de uma matriz orgânica [22]. Esta fase é quantificada pela presença de proteínas associadas a essa matriz, como o colagénio tipo I que representa cerca de 90% [22]. Outras proteínas constituintes de tal matriz orgânica são o colagénio do tipo III, V e X, proteoglicanos, osteonectina e

osteocalcina, etc [22]. A atividade de fosfatase alcalina (ALP) é outro marcador biológico da diferenciação dos osteoblastos [22];

- Mineralização da matriz óssea: Fase final do processo, comumente verificada pela quantidade de cálcio extracelular depositado [22];

A análise comparativa entre os resultados alcançados em testes *in vitro* e *in vivo* é impossível no estado atual da literatura pois os dados recolhidos nos testes *in vivo* são em muito menor quantidade em relação aos testes *in vitro*. De fato, o principal indicador é a taxa de sucesso do tratamento por estimulação eletromagnética.

2.3. Resposta à estimulação celular CC

2.3.1. *In Vitro*

Proliferação

Vários estudos reportaram um aumento de síntese de DNA para diferentes estímulos. Identificou-se que o impacto osteogénico está associado à conjugação de várias características do estímulo, nomeadamente:

- Baixas frequências (inferiores a 60 Hz) em culturas celulares de MC3T3-E1 [23], para uma grande gama de campos elétricos (1×10^{-7} a 32 V/cm). O mesmo não acontece para culturas de TE-85 [24], ou aparece com menor impacto em culturas MC3T3-E1 para altas frequências [3], [23]–[26]; A realçar que este estímulo revelou-se igualmente osteogénico tanto para a configuração paralela como para uma configuração em co-superfície (com padrão listrado);
- Elevados tempos de exposição em culturas MC3T3-E1 [26];
- Baixas frequências (16 Hz) em culturas primárias para uma grande gama de campos elétricos (1×10^{-7} a 60 V/cm) [27]–[29]. O mesmo efeito não é observado para diferentes frequências [29];
- Baixas frequências (3 Hz) e campos elétricos que não sejam próximos de 23 V/cm em culturas primárias e celulares de MC3T3-E1 [23], [30], [31]. Observa-se assim um comportamento não linear na proliferação celular com a variação do campo magnético.

Diferenciação e mineralização

Poucos estudos indicaram aumentos consideráveis de diferenciação e mineralização celular. A estimulação de linhas celulares de SaOS-2 com 0,1 V/cm, 62,5 kHz, 4 h/dia resultou em aumentos de vários marcadores de diferenciação osteogénica (atividade ALP, Colagénio 1, ON, OPN e BSP) e na matriz de mineralização (480% após 28 h de estimulação elétrica [32]. Um aumento na osteocalcina (OC) foi observada em células estaminais hMSCs pós 14 dias de estimulação elétrica de 6 h/dia a 6 kHz [33].

Em culturas primárias de bovino registou-se um aumento entre 200 a 300 % de atividade ALP para um estímulo de 7 dias, 24 h/dia, 16 Hz e 60 V/cm [27]. Após 18 dias de estimulação nas mesmas condições, verificara-se ainda um aumento dos marcadores de diferenciação como FN, ON, Col 1, BSP, OPG e OC [27]. Aumentos de 307% de Ca^{2+} em culturas primárias de

osteoblastos de rato na fase de mineralização com estimulação elétrica durante 21 dias, 6 h/dia a 10 Hz [34].

Também só dois estudos obtiveram resultados osteogénicos quanto à diferenciação e mineralização usando estimuladores capacitivos com configuração em co-superfície (Figura 5) [3], [35]. Segundo uma configuração em co-superfície com padrão interdigitado, estimularam-se culturas celulares MC3T3-E1 e células estaminais BMSCs (ambas em estado confluyente) com estímulos sinusoidais de 1 kHz de frequência durante 12 dias (24 h/dia) [35]. Em ambas as experiências registou-se atividades acrescidas da ALP em relação ao controlo (+43,59% após 9 dias para as linhas celulares; +11,3% após 3 dias para as células estaminais), embora também se observasse uma menor taxa de diferenciação para longos períodos de estimulação de células BMSCs [35]. Um sistema capacitivo com uma configuração em co-superfície com padrão listrado também foi ainda proposto por Soares dos Santos et al. [3] para estimular células MC3T3-E1, aplicando um estímulo com as seguintes características:

- Estímulo BF: 0,3 V/mm, 14 Hz, 4 h/dia durante 21 dias;
- Estímulo AF: 0,5 V/mm, 60 kHz, 0,5 h/dia durante 21 dias.

Este estudo mostrou a potencialidade deste sistema de estimulação para aumentar os níveis de colagénio tipo I durante o período de maturação da matriz, tanto para as altas frequências como para baixas (BF: +1,75% e + 56,7%; AF: +100% e +80%, ao 7º e 14º dia, respetivamente) [3]. Adicionalmente, ligeiros impactos no terceiro estágio de osteogénese foram alcançados para o estímulo de baixa frequência [3].

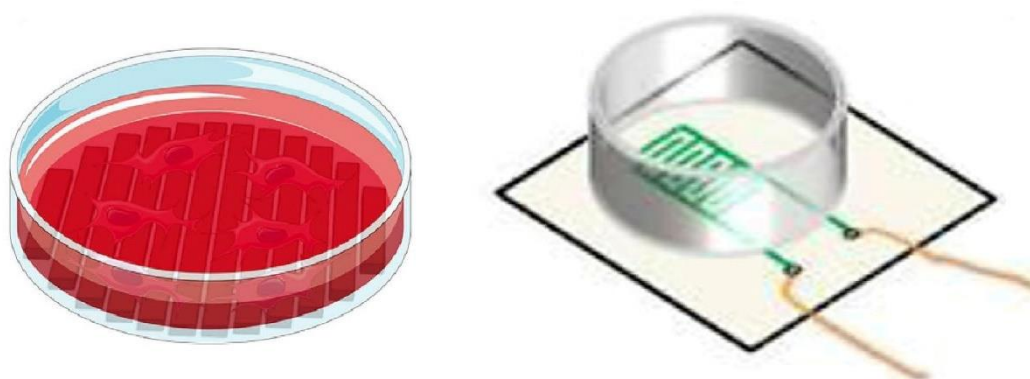


Figura 5 - Exemplos de configuração dos elétrodos numa só superfície (**direita**: co-superfície padrão listrado [3], **esquerda**: interdigitado [35]).

2.3.2. Scaffolds

Células Saos-2, cultivadas num substrato à base de polilactida biodegradável (95 wt%) e polipirrol bio-ativado com heparina (PPy/HE) (5 wt%), foram estimuladas com 0,2 V/cm durante seis dias com três períodos de estimulação elétrica de seis horas. Neste teste registaram-se adesão osteoplástica e proliferação [36]. Verificou-se ainda um aumento nos marcadores de diferenciação como o ALP (+57,5%), BMP2 (+60%) e RUNX-2 (+37,04%) [36], assim como um aumento de osteocalcina (53,33%) [36]. Notou-se também uma maior acumulação mineral após o período de estimulação [36]. Numa cultura semelhante à descrita acima, aplicaram-se estímulos de 0,2 e 0,4 V/cm entre 2 a 8 horas [37]. Aumentos de até 120% na fase de proliferação (48 h após o estímulo elétrico) foram observados. Os níveis de osteocalcina também se monitorizaram superiores aos do controlo, expressão que chegou a atingir os +60% [37]. A análise destes estudo permite concluir que o estímulo de 0,2 V/cm é regulador do gene de ativação de osteocalcina e promove a secreção destes pelos osteoblastos [37].

Às células MG63, semeadas em três diferentes scaffolds (puro PCL, PCL/CNT (0,2 wt%) e PCL/ β -TCP (20 wt%)), foi aplicado um estímulo com uma frequência de 60 Hz, uma intensidade de campo elétrico de 55×10^{-3} V/cm, durante 30 min/dia ao longo de 3 dias [38]. Em todos os scaffolds se observaram níveis de sub-regulação na proliferação celular, Este fenómeno foi atribuído à força eletroforética, que poderá ter provocado um movimento de fluído no meio e nas células, separando as células proliferadas já conectadas [38]. Já numa fase de diferenciação, a melhor resposta com base na atividade ALP foi nos scaffolds compostos por PCL/ β -TCP (20 wt%), com um aumento que atingiram os +22,5% e +65% [38]. O mesmo scaffold também se mostrou o mais eficaz para potenciar a sobre-expressão de cálcio, a qual alcançou aumentos até +50% duas semanas após a estimulação.

Foram ainda testados scaffolds de seda com uma cultura de células hMSCs. A estimulação deste sistema biológico com 60 kHz de frequência, 1 h/dia durante 28 dias, resultou em comportamentos osteogénicos não lineares: efeitos proliferativos entre +22% e -46%; efeitos diferenciativos entre +63% e -11%; e efeitos na mineralização entre +100% e -7% [39]. Podemos assim concluir que a estimulação eletromagnética pode alterar significativamente o comportamento osteo-regenerativo em scaffolds.

2.3.3. In vivo

A grande percentagem dos estudos *in vivo* sobre estimulação eletromagnética capacitiva para a regeneração óssea baseia-se em cobaias/pacientes com quadro clínico de fratura. Os resultados apenas destacam o sucesso/fracasso da estimulação no tratamento da fratura (não realizam a monitorização de importantes marcadores osteogénicos). É importante ainda salientar que a maior parte dos estudos usou estimuladores com elétrodos circulares com configuração paralela, os quais foram colocados exteriormente sobre a fratura (Figura 6).

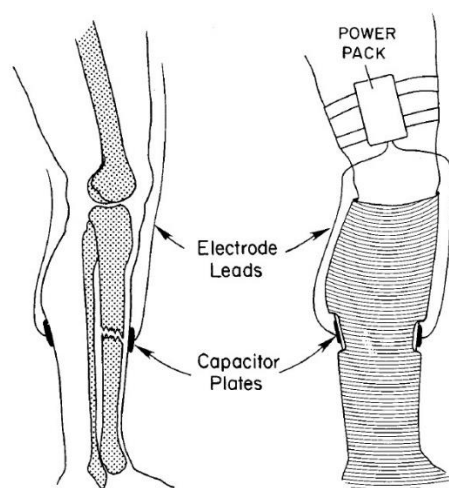


Figura 6 - Estimulação elétrica capacitiva in vivo numa fratura [40].

Uma análise crítica a estes testes em pacientes humanos permite concluir que:

- Os estudos foram conduzidos em múltiplas regiões e em todas se observou regeneração óssea mais acentuada;
- A excitação exterior sinusoidal de 5V aparece como a mais usada, mas o estímulo resultante (desconhecido) mostra potencial osteogénico para uma frequência de 60 kHz;
- Uma estimulação de 8 h/dia durante 10 semanas é suficiente para se obter taxas de sucesso na cura da fratura superiores a 80% [41]. Taxas de sucesso ainda superiores (próximas de 100%) foram observadas para um estímulo de 24 h/dia durante 12 a 24 semanas [42];
- Os campos eletromagnéticos criados pelos estímulos capacitivos demonstraram-se capazes de estimular e aumentar o transporte de cálcio.

Já usando cobaias animais é de referir que:

- Para além de se estudar o efeito de estimulação elétrica no tratamento de fraturas, também se analisou o seu efeito na diminuição ou suavização dos efeitos da osteoporose;
- A frequência maioritariamente utilizada é 60kHz, havendo apenas dois estudos onde se recorreu aos 16Hz;
- Em quase todos os casos alcançaram-se taxas de sucesso da união de fraturas através da estimulação eletromagnética [43]. Verificou-se a melhoria significativa da qualidade do tecido ósseo e da densidade óssea [44];
- A gama de excitação exterior (aplicada aos elétrodos) que mais se revelou adequada encontrou-se entre os 5 a 10 V (pico-a-pico). Valores inferiores não se revelaram com potencial para alterar a regeneração óssea [45];
- Os resultados clínicos demonstraram que com 2 h/dia durante 60 dias de estimulação consegue-se atenuar eficazmente a perda de minerais nos ossos de ratos osteoporóticos [46].

2.4. Análise crítica

Todos estes estudos mostram a eficácia da estimulação eletromagnética usando sistemas capacitivos, mas também a dificuldade na identificação dos estímulos mais osteogénicos. A descrição dos estímulos biofísicos ao longo das estruturas biológicas é geralmente menosprezada. No geral é possível afirmar que os estudos se têm focado na cultura celular. Convém também realçar que é dominante o uso de estimuladores capacitivos com configuração paralela.

Das propriedades do estímulo descritas em estudos *in vitro*, a forma de onda sinusoidal é a predominante. Apesar de existirem estudos que recorrem a altas frequências (na casa dos kHz), as mais frequentes encontram-se entre 3 e 24 Hz. Já nos estudos *in vivo* a frequência predominante é 60 kHz. Este fenómeno é, muito provavelmente, devido à variação da permissividade elétrica ao longo do espetro de frequência [47]. De fato, a resistência à formação de campo elétrico diminui com o aumento da frequência tanto em osso cortical como em osso trabecular [47]. Em termos globais, a amplitude do campo elétrico aplicada nos elétrodos nos estudos em humanos varia entre os 5 e 10 V pico-a-pico, sendo 5 V a opção mais vezes tomada. A identificação do estímulo do campo elétrico não tem sido realizada. Finalmente, é ainda problemático encontrar o potencial osteogénico associado ao tempo de exposição à estimulação eletromagnética. A variabilidade usada neste parâmetro não permite a realização de uma análise comparativa. Não existe ainda um método standard de teste que permita analisar sistematicamente a influência de cada parâmetro do estímulo na ósseo-regeneração.

Capítulo 3

3. Modelos Computacionais

3.1. Configuração dos sistemas capacitivos

3.1.1. Co-superfície listrado

A primeira configuração considerada neste estudo comparativo é o capacitivo em co-superfície com padrão listrado, tal como proposto por Soares dos Santos *et al.* [3]. É composto por um conjunto de 12 elétrodos de 1 mm de espessura, 2 mm de largura e comprimento variável (2x 12 mm, 2x 20 mm, 2x 25 mm, 2x 28 mm, 2x 30 mm e 2x 31 mm) ao longo de um plano. Estes comprimentos foram assim definidos para uma adequada estimulação *in vitro* de estruturas celulares cultivadas em placas de Petri (32 mm de diâmetro). Todas as listras encontram-se espaçadas entre si por uma distância de 0,5 mm. Na Figura 7 é possível observar a disposição dos elétrodos nesta configuração.

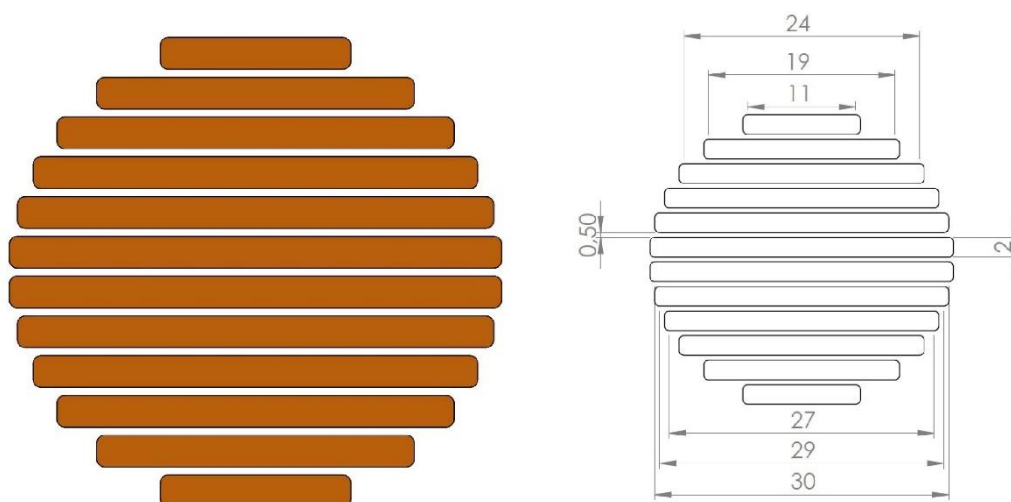


Figura 7 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão listrado.

3.1.2. Co-superfície Interdigitada 1.0

Esta configuração é constituída apenas por 2 elétrodos, cada um com 6 listras entrelaçadas entre si. Têm 2 mm de largura, 1 mm de espessura, espaçamento entre si de 0.5 mm e comprimentos variáveis, de acordo com a Figura 8. Estas listras assim definidas configuram uma estrutura circular igualmente adequada para testes biológicos *in vitro* com placas de Petri. Não só a sua circularidade, mas também as dimensões, são adequadas para uma comparação sistemática dos campos elétricos e magnéticos ao longo das estruturas celulares.

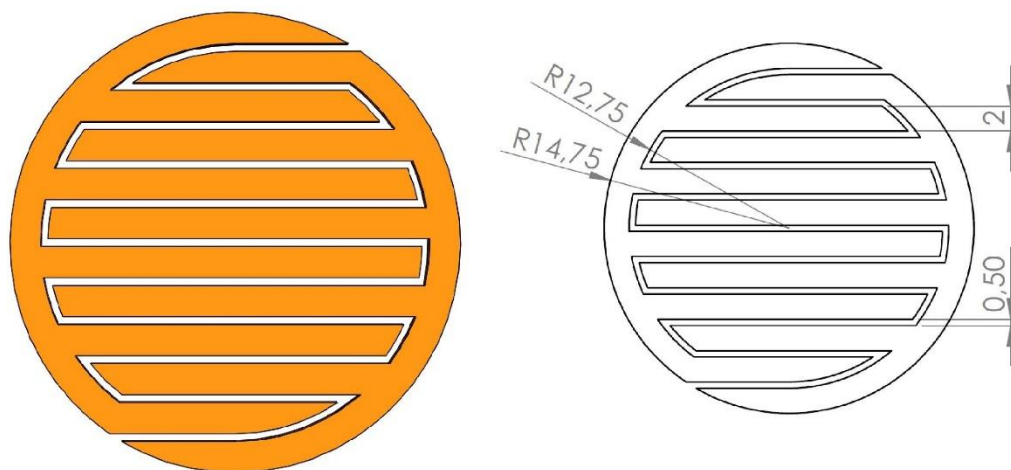


Figura 8 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão interdigitado 1.0.

3.1.3. Co-superfície Interdigitada 2.0

Esta configuração é idêntica à acima descrita, apenas se diferenciando em algumas dimensões dos elétrodos, nomeadamente espessura e largura. Esta é uma nova versão da interdigitada 1.0 com listras de 1 mm de largura exceto as últimas, que foram definidas com 2 mm, e 0,1 mm de espessura. O número de listras também aumentou de 6 para 10 com estas alterações, resultando num diâmetro de 31,5 mm. Na Figura 9 é possível observar a disposição dos elétrodos nesta configuração. Esta configuração foi analisada pois, por estar a ser testada experimentalmente num estudo *in vitro*, surge a necessidade de se identificar os estímulos eletromagnéticos por esta produzidos.

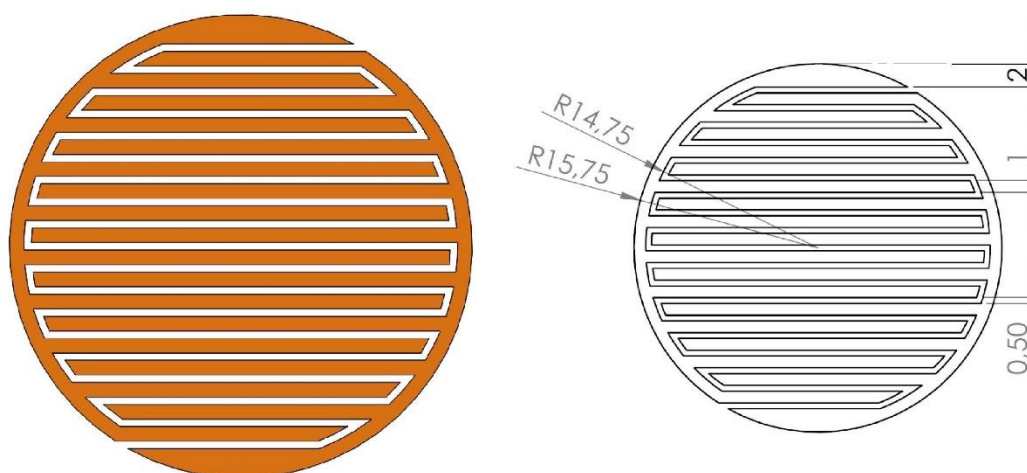


Figura 9 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície com padrão interdigitado 2.0.

3.1.4. Co-superfície Circular

Esta configuração é composta por 7 elétrodos circulares de 2 mm de largura, 1 mm de espessura e separadas entre si por 0,5 mm. O diâmetro do elétrodo mais próximo do centro foi definido com 2 mm; os diâmetros dos elétrodos mais afastados vão sendo aumentados gradualmente até aos 32 mm, de forma a se adaptarem ao diâmetro de 32 mm da placa de Petri. Na Figura 10 é possível observar a disposição dos elétrodos nesta configuração. Estas dimensões foram assim definidas para uma adequada comparação sistemática dos campos elétricos e magnéticos ao longo das estruturas celulares.

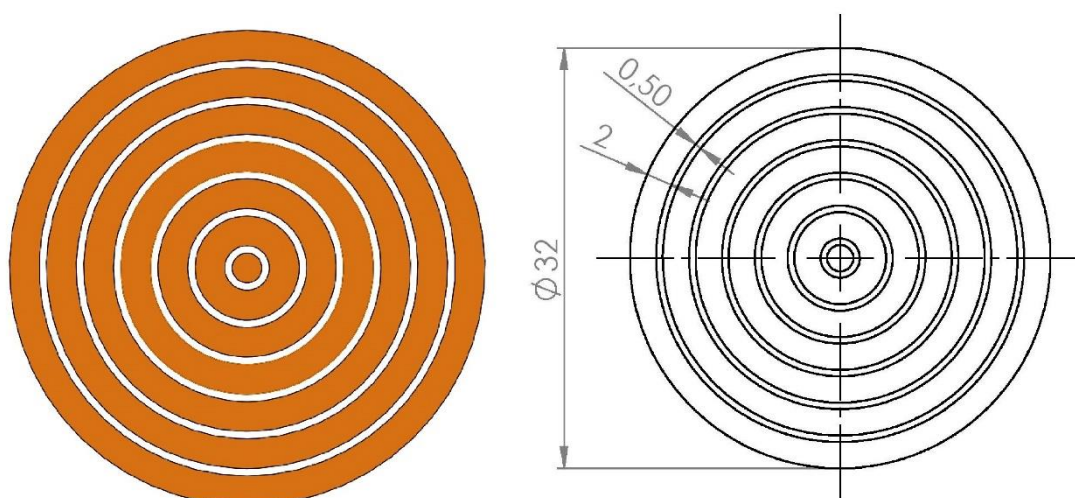


Figura 10 - Disposição dos elétrodos na configuração co-superfície circular.

3.1.5. Configuração Paralela

A configuração paralela é composta por dois eletrodos circulares com diâmetro de 35 mm e espessura de 1 mm. A placa de Petri, contendo a cultura celular, localizar-se-á entre os eletrodos. A distância entre eles é dependente da confluência do meio celular: 1,52 mm para meios celulares em confluência total; 1,51 mm para meios celulares com baixa confluência. Esta distância resulta do somatório das espessuras da placa de Petri, meio fisiológico e meio celular. Assim, apenas um dos eletrodos aparece em contato com o meio, pois o outro apenas está em contato com a placa de Petri [3]. Na Figura 11 é possível observar a disposição dos eletrodos nesta configuração.

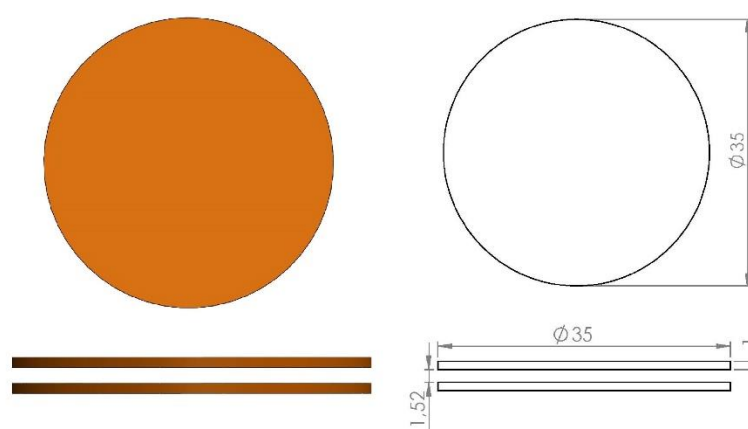


Figura 11 - Disposição dos eletrodos na configuração paralela.

3.2. Modelos completos

Para o desenvolvimento dos modelos computacionais, considerou-se o aparato usual de teste *in vitro*, conforme descrito por Soares dos Santos *et al.* [3]. Assim, os modelos a simular incluem uma cultura de células (em estado de repouso) numa placa de Petri, que será estimulada através de estímulos elétricos provenientes de eletrodos localizados sob a mesma. Todas as configurações foram projetadas para estimular uma cultura de células numa placa de Petri de 35 mm de diâmetro, cultura essa que foi posicionada sobre os estimuladores, que por sua vez estão colados a um substrato polimérico. A espessura da placa de Petri de 0,5 mm evita o contato direto células-eletrodos. O cobre foi escolhido como material para os eletrodos devido à sua elevada condutividade elétrica. A placa de Petri e o substrato têm como material poliestireno e policarbonato, respectivamente, devido à sua elevada resistência elétrica. Tomou-se como pressupostos a adesão das células MC3T3 a superfícies de poliestireno [48], assim como a separação entre meio fisiológico (solução líquida de 1 mm de espessura) e meio celular [3], embora o meio celular considerado subjacente ao meio fisiológico. Todos estes componentes foram, por fim, cercados por uma camada de ar. Para melhor compreensão dos modelos completos do estimulador capacitivo em co-superfície, apresenta-se a Figura 12, a qual inclui uma vista explodida dos domínios. Embora as disposições dos eletrodos sejam diferentes entre

as configurações de estimuladores em co-superfície projetados, esta mesma estrutura foi considerada. A representação dos domínios para o modelo da configuração paralela encontra-se na Figura 13. Também se encontram enumeradas as propriedades biofísicas (elétricas e magnéticas) e dimensionais dos vários domínios considerados (Tabela 1) [3]. De referir que a dimensão da envolvente (ar) foi determinada após o estudo da convergência (Capítulo 4).

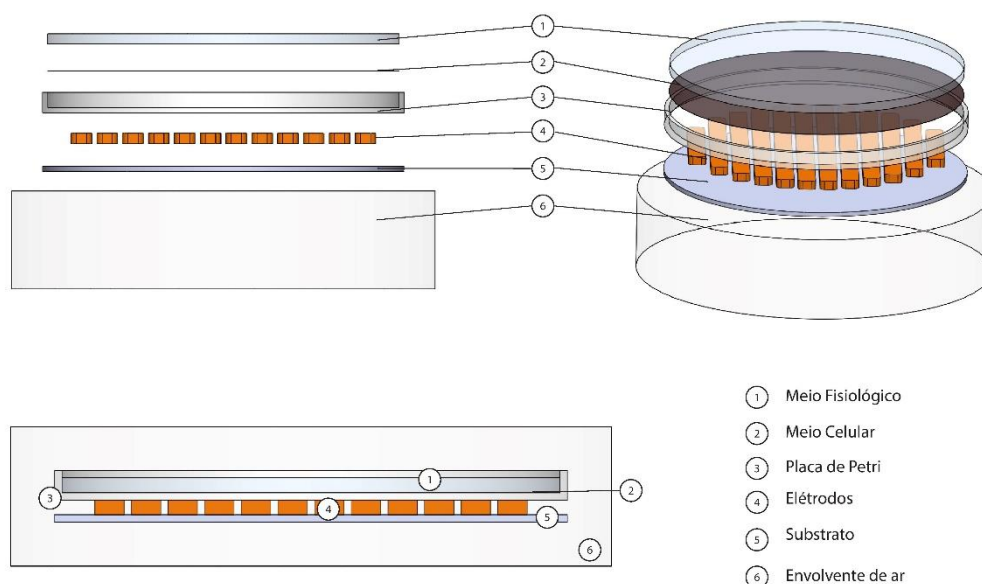


Figura 12 – Domínios do modelo completo do estimulador capacitivo em co-superfície.

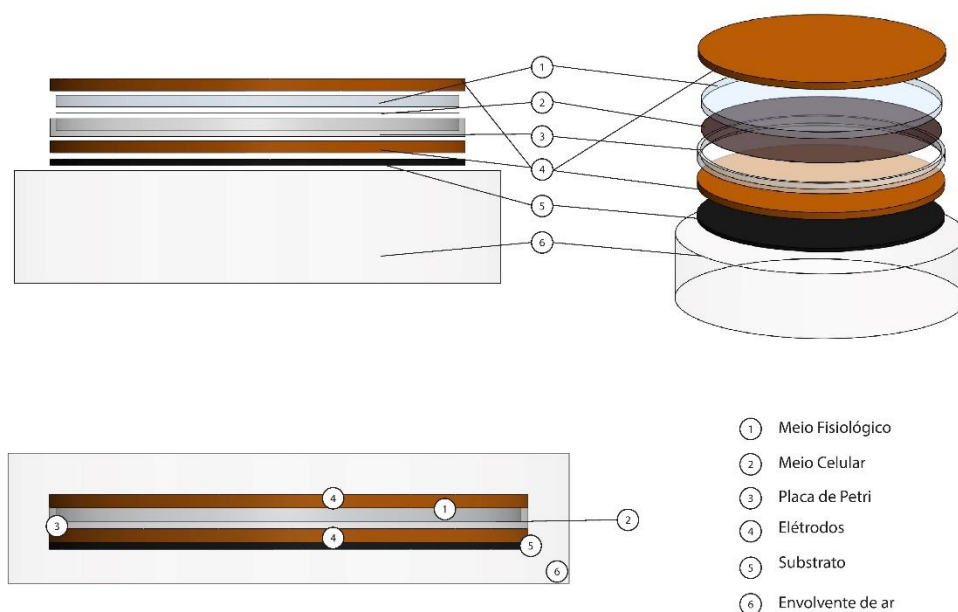


Figura 13 - Domínios do modelo completo do estimulador de configuração paralela.

Tabela 1 - Propriedades elétricas e magnéticas dos domínios dos modelos completos e simplificados, e resumo das suas propriedades dimensionais [3].

Componentes	Condutividade elétrica [S/m]	Permitividade elétrica relativa	Permeabilidade magnética relativa	Dimensões	
				Modelo Real	Modelo Simplificado
Substrato	$6,7 \times 10^{-14}$	3	0.8666	Diâmetro: 35mm Altura: 0,5mm	Diâmetro: 14mm Altura: 0,5mm
Placa de Petri	$6,7 \times 10^{-14}$	2.6	1	Diâmetro: 35mm Altura: 2mm Espessura: 0,5mm	Diâmetro: 14mm Altura: 2mm Espessura: 0,5mm
Meio Celular (baixa confluência)	$1,2 \times 10^{-7}$	73	1	Diâmetro: 34mm Altura: 10 μm	Diâmetro: 13mm Altura: 10 μm
Meio Celular (confluência total)	$1,2 \times 10^{-7}$	73	1	Diâmetro: 34mm Altura: 20 μm	Diâmetro: 13mm Altura: 20 μm
Meio Fisiológico	1,6	73	1	Diâmetro: 34mm Altura: 1mm	Diâmetro: 13mm Altura: 1mm
Ar	0	1	1	Diâmetro: 41mm Altura: 9,5mm	Diâmetro: 20mm Altura: 9,5mm
Elétrodos	$6,0 \times 10^7$	1	1	Largura: 2mm* Espessura: 1mm* Comprimento: variável entre configurações	Largura: 2mm* Espessura: 1mm* Comprimento: variável entre configurações

* exceto configuração em co-superfície interdigitada 2.0 onde largura: 1mm e espessura: 0,1mm

3.3. Modelos Simplificados

Tendo em conta a simetria inerente às configurações em co-superfície, também se analisaram modelos simplificados para minimizar o custo computacional. Tomando apenas parte do modelo completo suficiente para identificar a dinâmica da estimulação, pode assim minimizar-se o tempo de simulação e manipulação de dados. Em todos os modelos simplificados apenas se consideraram 3 elétrodos, mas mantendo as suas larguras, espessuras e espaçamento entre eles. Consideraram-se ainda placas de Petri adaptadas a esta simplificação (diâmetro 14 mm). Para uma comparação sistemática, também se projetou um modelo simplificado do estimulador de configuração paralela, onde apenas se atualizou o diâmetro dos elétrodos. Nas Figuras 14 a 18 é possível observar a diferença entre os modelos simplificados e os completos para as diferentes configurações, e na Tabela 1 uma enumeração das propriedades dimensionais dos vários domínios dos modelos simplificados [3]. Deve-se salientar que estes estimuladores (referentes aos modelos simplificados) mantêm uma configuração

adequada para serem usados em implantes ósseos instrumentados. Por isso, a análise é, em si mesma, válida e necessária.

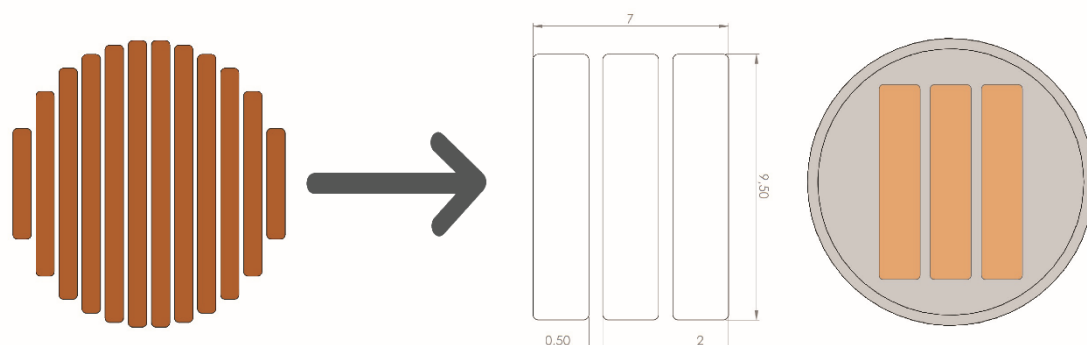


Figura 14 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície listrada.

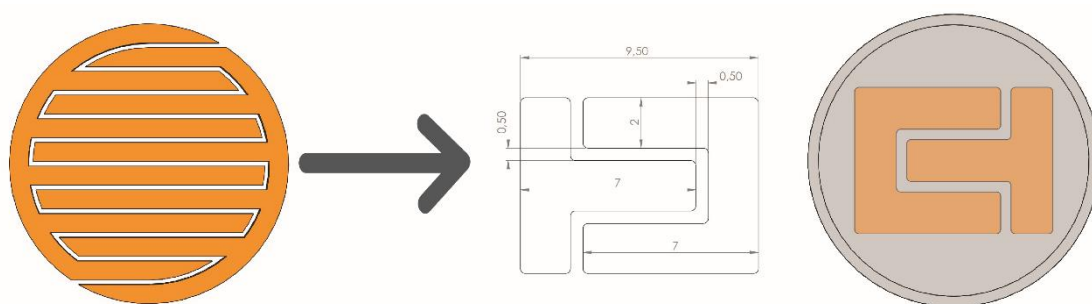


Figura 15 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.

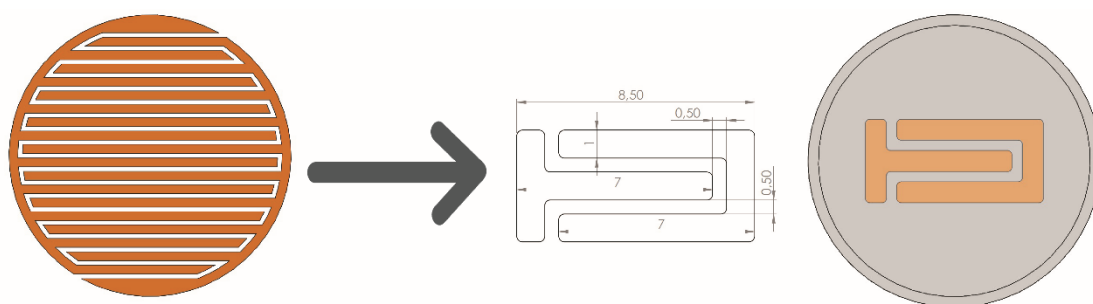


Figura 16 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.

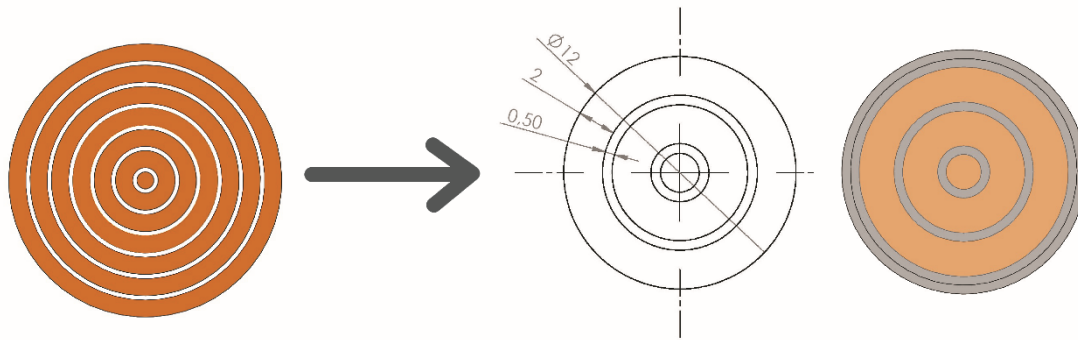


Figura 17 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração em co-superfície circular.

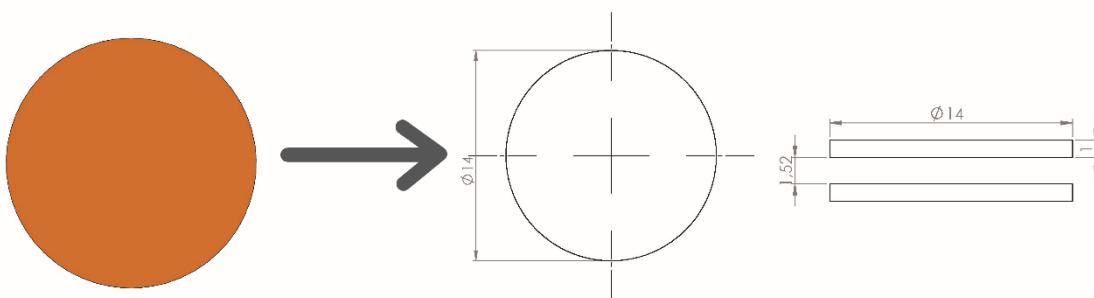


Figura 18 - Modelo completo e modelo simplificado da configuração paralela.

Capítulo 3

4. Métodos

4.1. Softwares

Para a implementação dos modelos, recorreu-se a dois softwares: o SolidWorks foi usado para a modelação dos componentes; o COMSOL Multiphysics foi escolhido para a simulação dos campos elétrico e magnético ao longo do meio celular.

4.1.1. SolidWorks 2016

O SolidWorks é um software de CAD (computer-aided design) e baseia-se em computação paramétrica, criando formas tridimensionais a partir de formas geométricas elementares. No ambiente do programa, a criação de um sólido ou superfície tipicamente começa com a definição de topologia num esboço 2D ou 3D. A topologia define a conectividade e certos relacionamentos geométricos entre vértices e curvas, no esboço e externos ao esboço [49].

Neste programa foram modelados todos os componentes do modelo a simular, os quais guardados com formato .step para serem importados para o COMSOL. É importante referir que o ficheiro .step também inclui o referencial criado na fase de montagem. Estes eixos foram posicionados na superfície superior dos elétrodos (Figura 19) para facilitar a identificação de coordenadas no COMSOL.

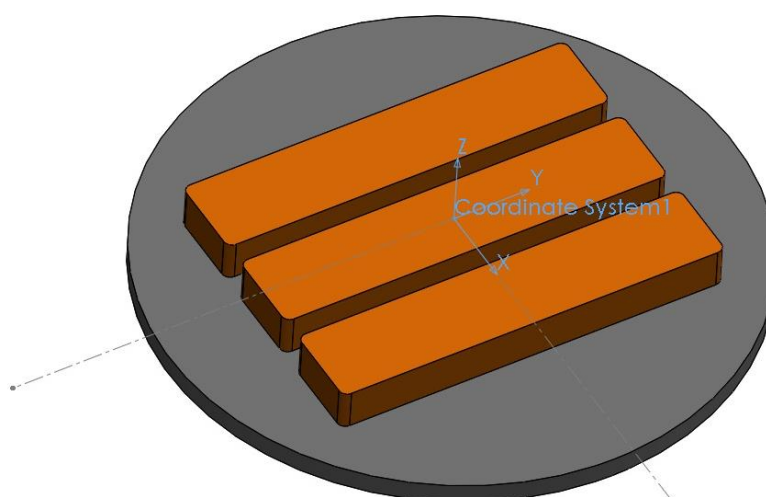


Figura 19 – Sistema de coordenadas criado no SolidWorks.

4.1.2. COMSOL Multiphysics® versão 5.2

COMSOL Multiphysics® é uma plataforma de software que usa o método de elementos finitos (FEM) para modelar e simular diferentes fenômenos da natureza tais como eletromagnéticos, mecânicos, químicos, acústicos, etc. [50]. Embora contenha uma biblioteca “multiphysics”, tendo potencialidade para analisar os efeitos resultantes de diversas “físicas”, apenas se considerou a dinâmica eletromagnética. Segue-se uma enumeração do procedimento realizado para a obtenção desta dinâmica:

1. Importação da geometria e referencial.
2. Atribuição a cada domínio das suas propriedades elétricas e magnéticas (Tabela 1).
3. Atribuição da frequência da excitação (exterior) dos elétrodos: 14 Hz (BF) e 60 kHz (AF).
4. Escolha do domínio de frequência como domínio de análise.
5. Escolha do tempo de amostragem: período/50. Com estas configurações definiram-se então excitações sinusoidais $K_p(1 - \cos(\omega t))$, $K_p = 5$, a aplicar a alguns elétrodos, como apresentadas na Figura 20.

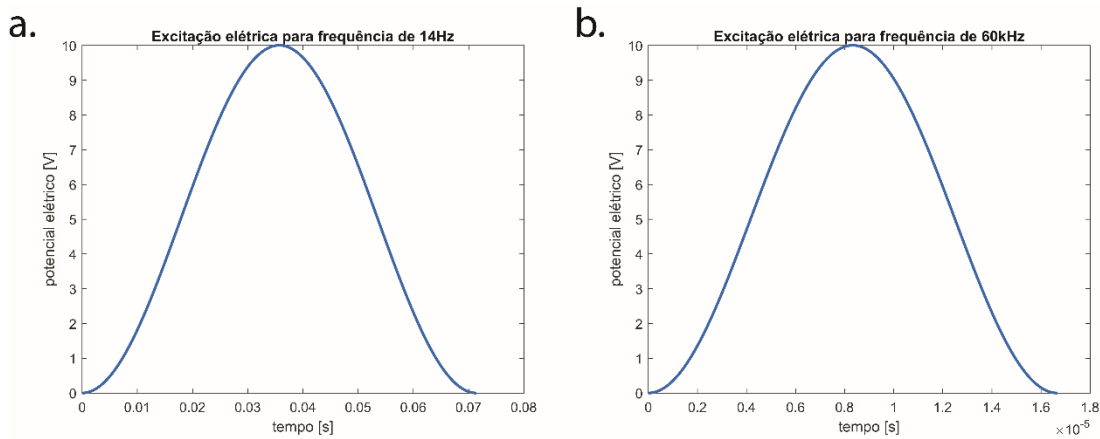


Figura 20 – Excitação aplicada aos elétrodos de cada uma das configurações: **a.** Frequência de 14 Hz; **b.** Frequência de 60 kHz.

6. Escolha do módulo para simulação da dinâmica eletromagnética: módulo AC/DC, opção “electric and magnetic fields (.mef)”. Assim é possível resolver as equações de Maxwell no domínio da frequência, de acordo com as equações (1) a (8):

$$\nabla \times J = 0 \quad (1)$$

$$E = -\nabla \times V - \frac{\partial A}{\partial t} \quad (2)$$

$$\nabla \times H = J \quad (3)$$

$$B = \nabla \times A \quad (4)$$

$$J = \sigma \times E + \frac{\partial D}{\partial t} \quad (5)$$

$$D = \varepsilon_0 \times \varepsilon_r \times E \quad (6)$$

$$B = \mu_0 \times \mu_r \times H \quad (7)$$

$$n_2 \times (J_1 \times J_2) = 0 \quad (8)$$

em que E é a intensidade do campo elétrico, D é o campo de deslocamento elétrico, H a intensidade do campo magnético, B a densidade do fluxo magnético, J a densidade de corrente, A o vetor do potencial magnético, ε_0 a permissividade do vácuo e ε_r a permissividade relativa, μ_0 a permeabilidade do vácuo e μ_r a permeabilidade relativa σ a condutividade elétrica, V o potencial elétrico e n_2 é a normal no meio dois na interface entre dois meios J_1 e J_2 são as densidades de corrente do meio 1 e 2.

7. Identificação dos elétrodos-ânodo e dos elétrodos-cátodo de forma alternada (Figura 21 e 22). Foi aplicada a excitação $K_p(1 - \cos(\omega t))$ [V] aos elétrodos-ânodo e 0 V aos restantes.

8. Criação de malha 3D com elementos tetraédricos de 2ª ordem (estão especificadas no capítulo 4.2.1).

9. Aquisição dos resultados da simulação (Figura 23): (a) num plano paralelo aos elétrodos localizado a meio da cultura celular ($Z=0,505$ mm em culturas não confluentes; $Z=0,51$ mm em culturas em estado de confluência); (b) numa linha ($y=0$ mm) transversal a este plano.

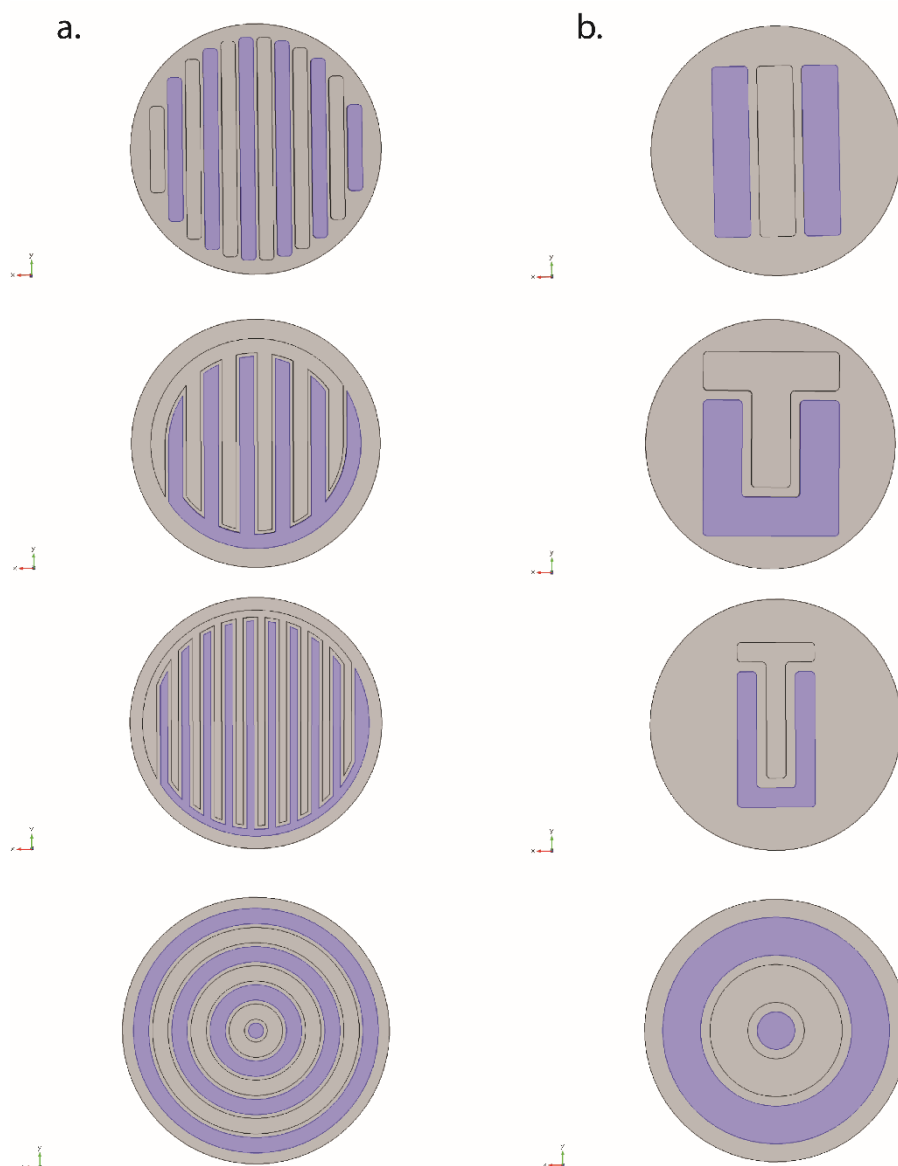


Figura 21 - Eléttodos-ânodo (a azul) e eléctodos-cátodo (a cinzento) nas configurações em co-superfície: **a.** Modelos reais; **b.** Modelos simplificados.

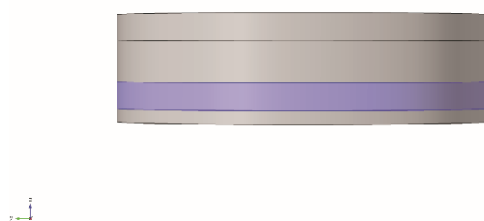


Figura 22 - Eléttodos-ânodo (a azul) e eléctodos-cátodo (a cinzento) na configuração paralela.

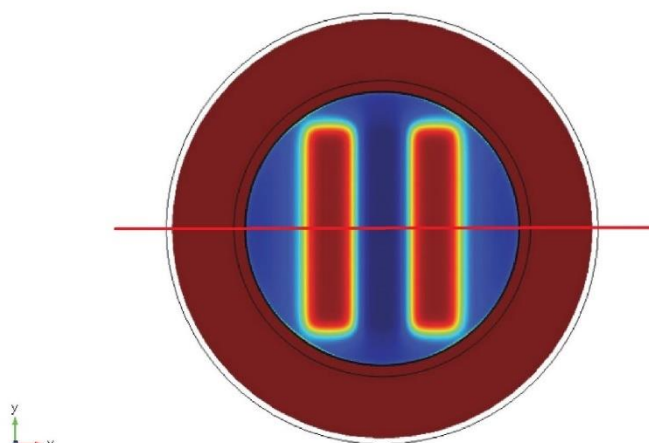


Figura 23 - Aquisição dos resultados da simulação num plano e linha transversal aos elétrodos.

4.2. Estudo de convergência

São dois os fatores que foram ainda analisados antes da realização das simulações: (i) a definição de malhas adequadas aos diversos domínios dos modelos; e (ii) as dimensões do domínio relativo à envolvente de ar de cada modelo. Ambos são indispensáveis para garantir a fiabilidade dos resultados, evitando (se possível) modelos desnecessariamente complexos. Para este fim, realizaram-se estudos de convergência ao modelo simplificado do sistema capacitivo em co-superfície listrado. O modelo simplificado foi usado devido aos menores tempos de simulação envolvidos.

4.2.1. Convergência das malhas

Para a análise da convergência de malha, foram utilizadas semelhantes malhas nos seguintes domínios:

- Parte 1: ar, substrato e meio fisiológico;
- Parte 2: elétrodos e placa de Petri;
- Parte 3: meio celular

Os seguintes testes de convergência foram então realizados (envolvente do ar de 2,98 cm³, ou seja, 3x3 mm de distância após os domínios):

- 1) Todos os domínios com tamanho standard “Coarse” (tamanho máximo: 3 mm; tamanho mínimo: 0,56 mm; número total de elementos: 23153);
- 2) Todos os domínios com tamanho standard “Normal” (tamanho máximo: 2 mm; tamanho mínimo: 0,36 mm; número total de elementos: 55896);

3) Todos os domínios com tamanho standard “Fine” (tamanho máximo: 1,6 mm; tamanho mínimo: 0,2 mm; número total de elementos: 188461);

4) Conjunto customizado 1 (número total de elementos: 112608):

- Parte 1: tamanho standard “Coarse”
- Parte 2: tamanho standard “Coarse”
- Parte 3: tamanho standard “Fine”

5) Conjunto customizado 2 (número total de elementos: 140967):

- Parte 1: tamanho standard “Coarse”
- Parte 2: tamanho standard “Normal”
- Parte 3: tamanho standard “Fine”

6) Conjunto customizado 3 (número total de elementos: 247777):

- Parte 1: tamanho standard “Coarse”
- Parte 2: tamanho customizado (tamanho máximo: 1,5 mm; tamanho mínimo: 0,2 mm)
- Parte 3: tamanho customizado (tamanho máximo: 1,4 mm; tamanho mínimo: 0,15 mm)

7) Conjunto customizado 4 (número total de elementos: 581021):

- Parte 1: tamanho standard “Normal”
- Parte 2: tamanho customizado (tamanho máximo: 1,4 mm; tamanho mínimo: 0,15 mm)
- Parte 3: tamanho customizado (tamanho máximo: 1 mm; tamanho mínimo: 0,1 mm)

As malhas customizadas foram desenvolvidas para a análise da influência de cada parte do modelo nos resultados de campo elétrico, e assim, o nível de refinamento necessário em cada parte. Todos os dados relativos à definição dos tamanhos de malha standard, assim como a especificação do conjunto de malhas customizadas, encontram-se descritos da Tabela 16 à 22 do anexo B.

Os resultados das simulações, ilustrados na Figura 24, mostraram que as malhas correspondentes aos testes 1, 2 e 4 têm erros de modelação significativos em relação à malha customizada 4 (teste 7) (erro médio de 9%). As restantes são muito melhores aproximações (erro médio da malha customizada 2 (teste 5): 0,87%; erro médio da malha customizada 3 (teste 6): 0,84%). Considerando o número muito elevado de elementos da malha customizada do teste 4 (teste 7), mesmo sendo o modelo simplificado, tomou-se a malha customizada 3 (teste 6) para simulação de todos os modelos, a qual permitiu que o tempo de simulação fosse geralmente inferior a 20 minutos.

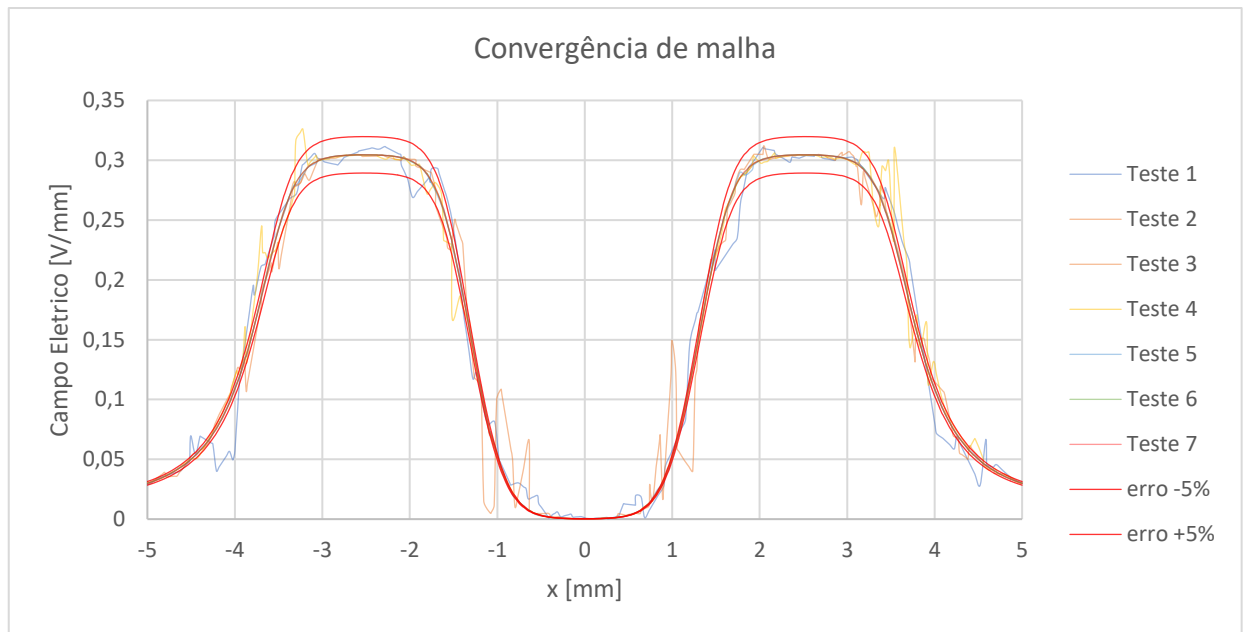


Figura 24 - CE no meio celular ao longo da linha ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0.51$ mm) para as diferentes malhas criadas, com uma excitação de 14 Hz.

4.2.2. Convergência da envolvente de ar

As dimensões do domínio relativo à envolvente de ar foram obtidas por um estudo de convergência, em que os resultados de campo elétrico foram analisados para diferentes volumes de ar cilíndricos considerando a malha customizada 3. Testaram-se os seguintes 4 volumes (Figura 25): $1,11 \text{ cm}^3$, $2,98 \text{ cm}^3$, $6,11 \text{ cm}^3$ e $21,34 \text{ cm}^3$ que equivalem a uma distância após os domínios de 1×1 mm, 3×3 mm, 5×5 mm e 10×10 mm, respetivamente. As Figuras 26 e 27 mostram os resultados dos campos elétricos com excitações de 14 Hz e 60 kHz. O volume da envolvente tem insignificante influência no campo elétrico para baixas frequências, mas o mesmo não se pode afirmar quanto às altas frequências: é necessário que o volume seja superior a $2,98 \text{ cm}^3$ para se obterem erros inferiores a 5% no CE em relação ao volume de $21,34 \text{ cm}^3$. Tomou-se o volume de $2,98 \text{ cm}^3$, ou seja, 3×3 mm de distância após os domínios, pois apresenta um erro médio de 2,2%.

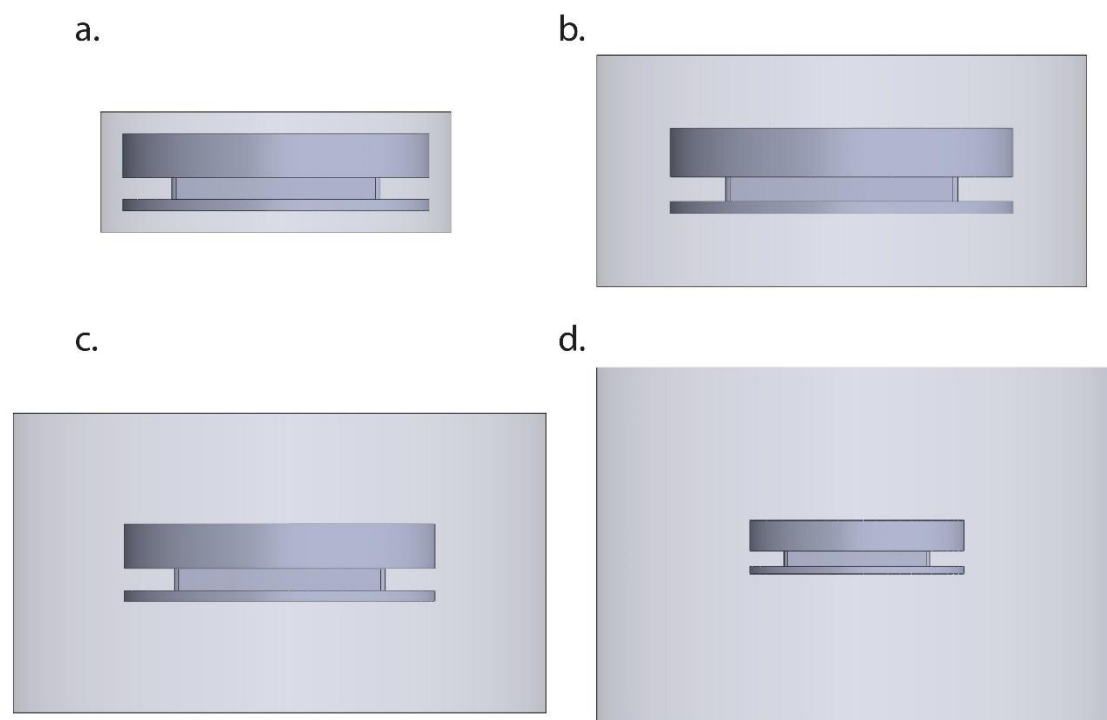


Figura 25 - Representação dos vários volumes de ar para o estudo de convergência da envolvente: **a.** 1,11 cm³; **b.** 2,98 cm³; **c.** 6,11 cm³; **d.** 21,34 cm³.

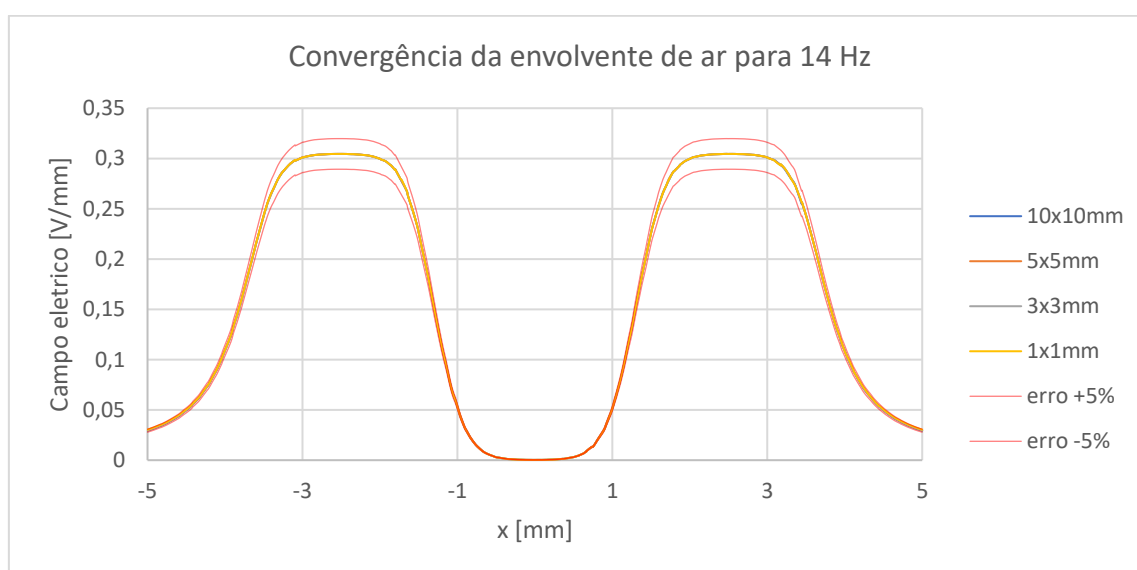


Figura 26 - Valores do campo elétrico no meio celular para cada envolvente de ar para 14 Hz.

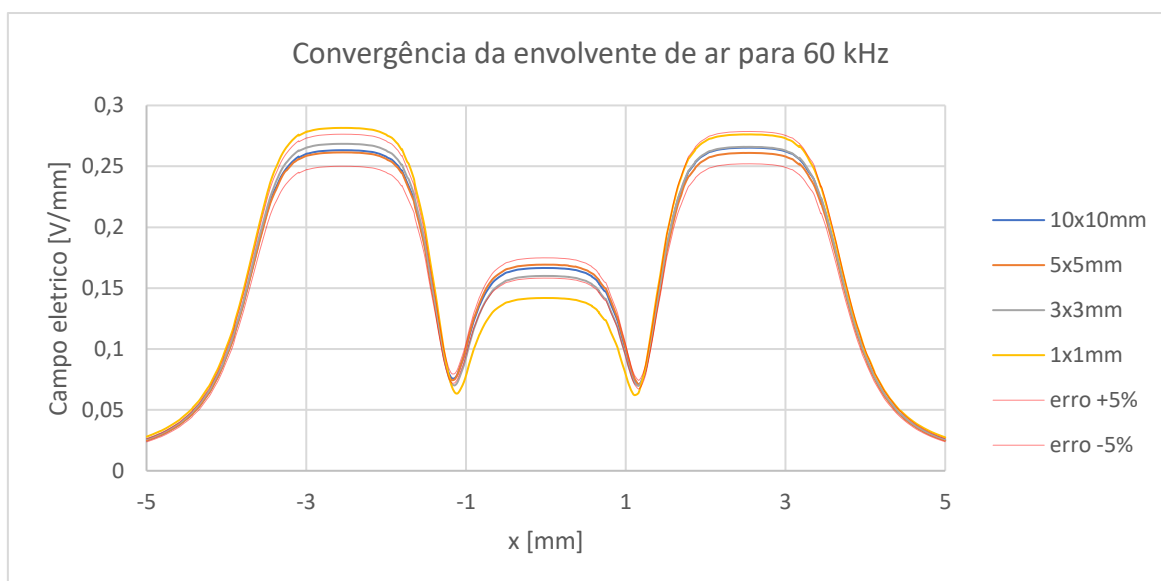


Figura 27 - Valores do campo elétrico no meio celular para cada envolvente de ar para 60 kHz.

Capítulo 5

5. Análise de Resultados

Neste capítulo é apresentada uma análise comparativa aos resultados dos campos elétricos e magnéticos aplicados pelas várias configurações de sistemas capacitivos aos meios celulares osteoblásticos. A análise inclui:

- A influência do estado de confluência na dinâmica do campo elétrico a estimular as culturas celulares.
- A influência da configuração do estimulador na dinâmica eletromagnética;
- A influência da variação dimensional dos estimuladores e validade dos modelos simplificados.
- A influência da amplitude da excitação na dinâmica eletromagnética.

De notar que a distribuição do campo magnético foi analisada aplicando um filtro passa baixo de primeira ordem (frequência de corte de 1 Hz) para efeitos de simplificação.

5.1. Influência do estado de confluência

Independentemente da frequência, configuração dos estimuladores e potenciais elétricos aplicados aos elétrodos, não se verificaram variações do campo elétrico com a variação do estado de confluência celular, como se pode observar na comparação presente nas Figuras 28 a 32. Assim, a análise comparativa posterior será realizada usando apenas um destes estados. Escolheu-se o estado de total confluência celular.

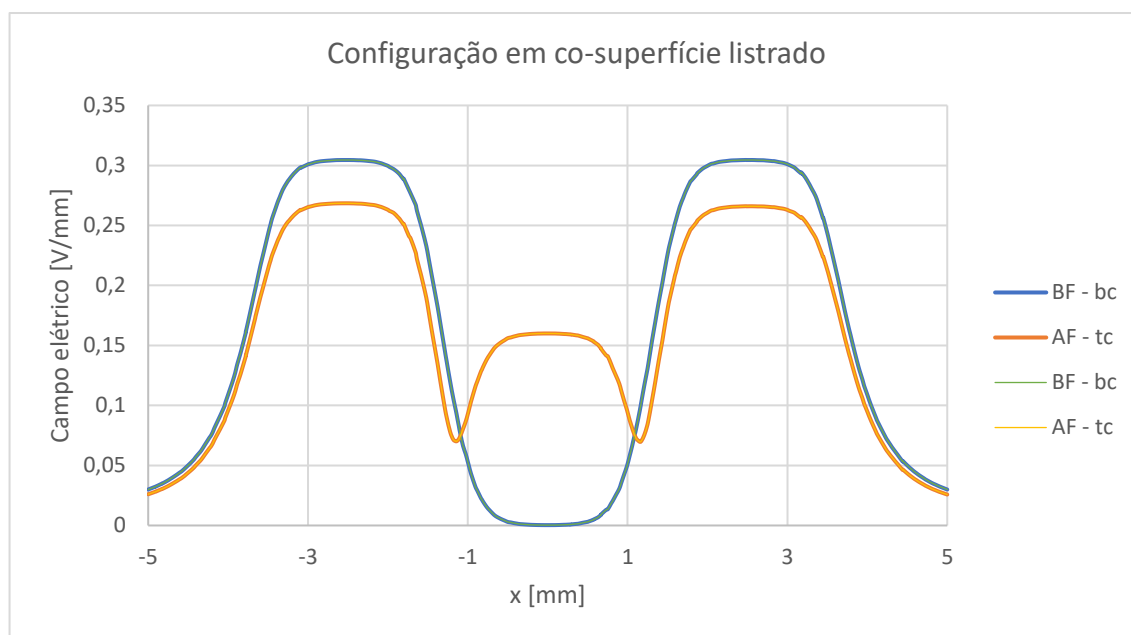


Figura 28 – Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície listrado (bc – baixa confluência; tc – total confluência).

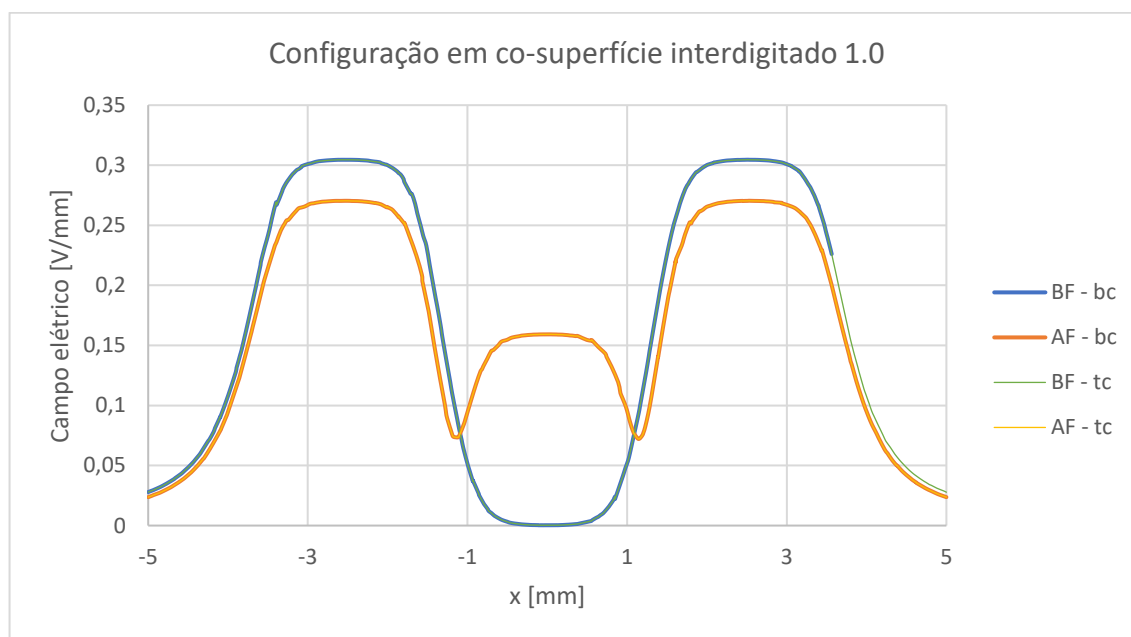


Figura 29 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície interdigitado 1.0 (bc – baixa confluência; tc – total confluência).

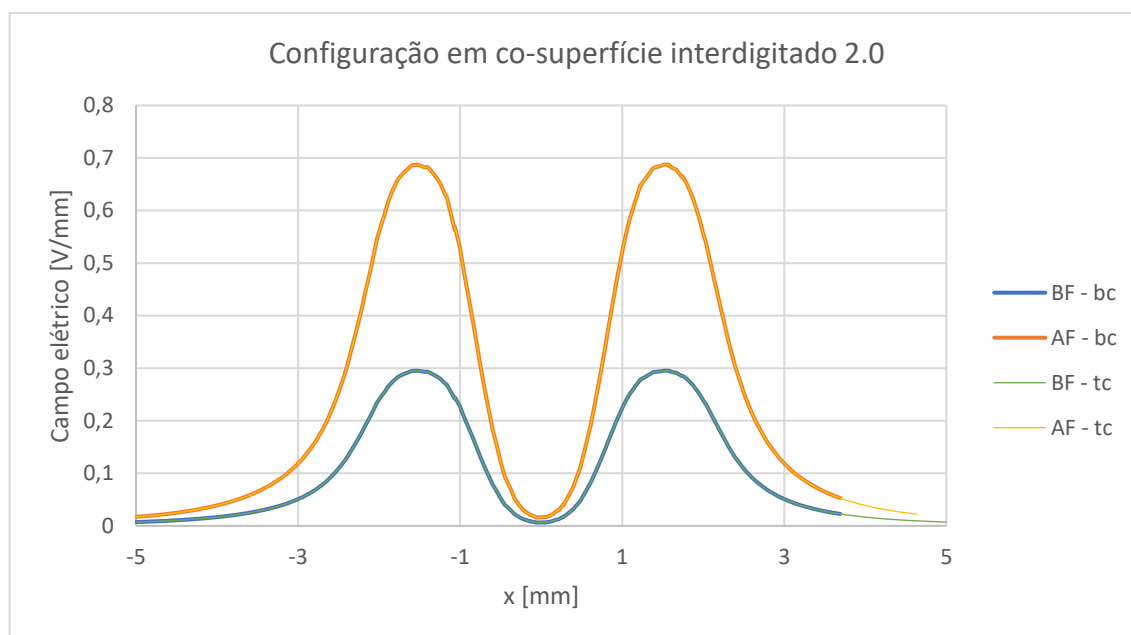


Figura 30 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície interdigitado 2.0 (bc – baixa confluência; tc – total confluência).

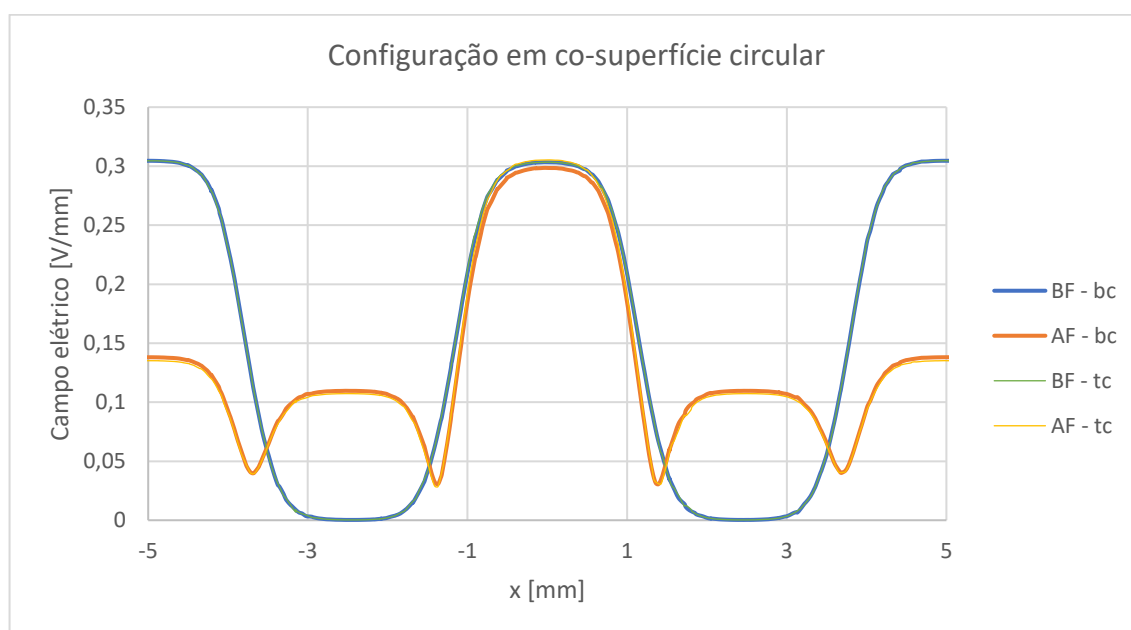


Figura 31 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração em co-superfície circular (bc – baixa confluência; tc – total confluência).

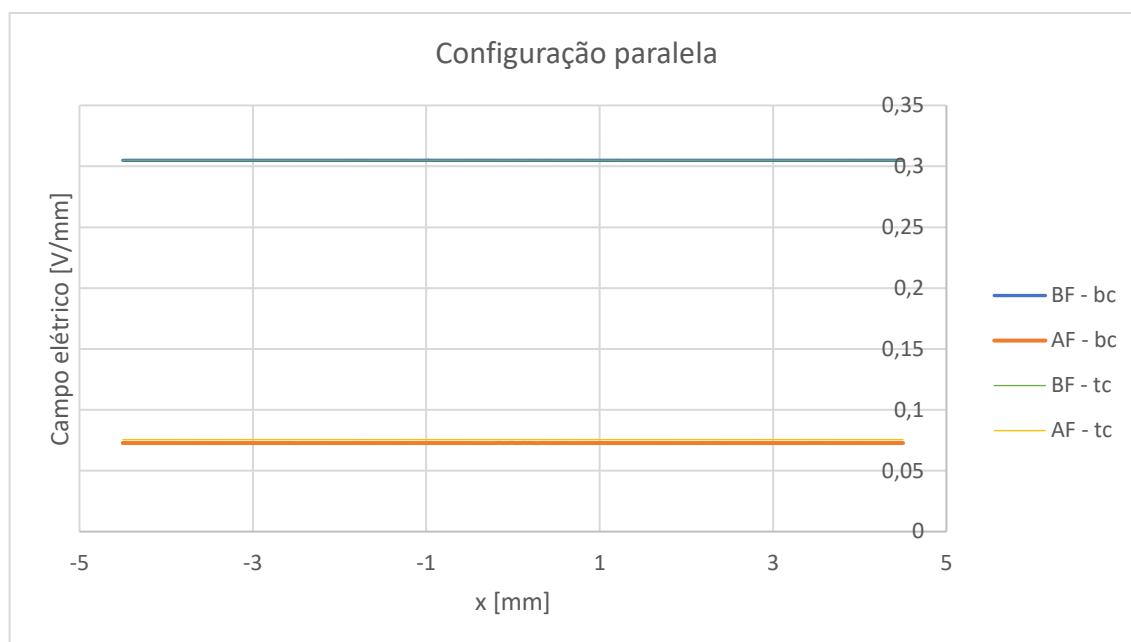


Figura 32 - Valores de CE para diferentes estados de confluência na configuração paralela (bc – baixa confluência; tc – total confluência).

5.2. Influência da configuração do estimulador

5.2.1. Configuração em co-superfície listrado

Esta configuração aplica um campo elétrico de forma heterogênea ao longo da cultura celular (Figura 33). O máximo campo elétrico ocorre nas regiões superiores aos elétrodos-ânodo, enquanto que o mínimo aparece na região superior aos elétrodo-cátodo. Esta heterogeneidade é também dependente da frequência: as baixas frequências garantem campos elétricos superiores em todas as regiões (na região superior aos elétrodo-cátodo observam-se 0,27 V/mm para 60 kHz e 0,30 V/mm para 14 Hz), exceto na região superior aos elétrodo-cátodo, em que o campo decresce para valores próximos de 0 V/cm (o mesmo nunca ocorre para a alta frequência). Por sua vez, o campo elétrico mínimo (inferior a 0,1 V/mm) para 60 kHz ocorre no espaçamento entre elétrodos. A dinâmica do estímulo do campo elétrico e magnético é muito similar à dinâmica da excitação exterior 14 Hz e 60 kHz, como se pode observar pela correlação próxima de 100% entre as formas de onda de ambos os campos elétricos e magnéticos e a excitação (Figura 60 à 63 no Anexo C). Ainda a referir que, de acordo com a literatura, a intensidade destes estímulos de campo elétrico está numa gama osteogénica [3].

Esta configuração é ainda capaz de aplicar um campo magnético que podem induzir osteogénese. Campo magnético numa gama de 50×10^{-3} A/mm (0,06 mT) para 14 Hz e 4×10^{-3} A/mm (0,005 mT) [51] para 60 kHz são espectáveis. Valores já identificados como osteogénicos encontra-se em intensidades entre 0,1 mT e 1 T, mas principalmente até 7 mT [52]–[54], mas também se verificou que os valores de campo magnético obtidos podem potenciar a osteogénese [55]. Não só a intensidade do campo magnético varia com a frequência (para baixas é cerca de 15 vezes superior), como é patente a forte heterogeneidade na distribuição espacial deste pela cultura celular. O comportamento do campo magnético, para cada frequência, apesar de algumas discrepâncias é semelhante, os campos magnéticos máximos

concentram-se nas regiões-interface, isto é, nas interfaces eléctrodo-eléctrodo e eléctrodo-placa de Petri, embora segundo um padrão fortemente irregular, e os mínimos sob o eléctrodo-ânodo (Figura 34). A literatura mostra que existe uma forte relação entre osteogenicidade e heterogeneidade na estimulação eletromagnética, embora ainda não se conheçam as causas do fenómeno com detalhe suficiente [32].

A Figuras 35 mostra, respetivamente, as distribuições dos campos eléctricos e magnéticos por todo o meio celular.

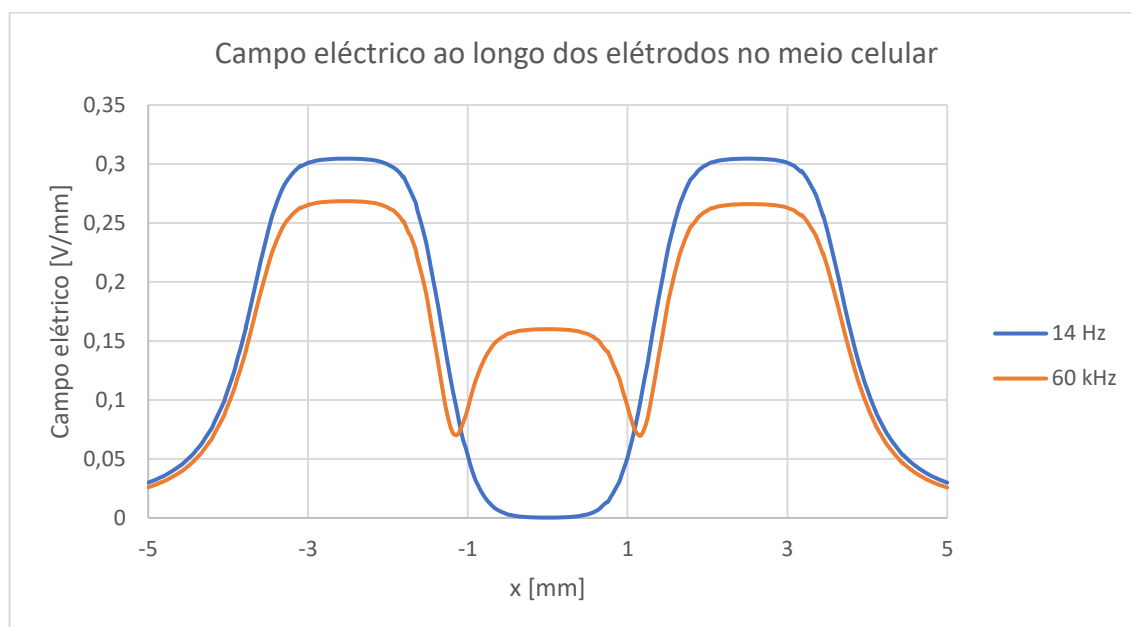


Figura 33 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado para BF e AF.

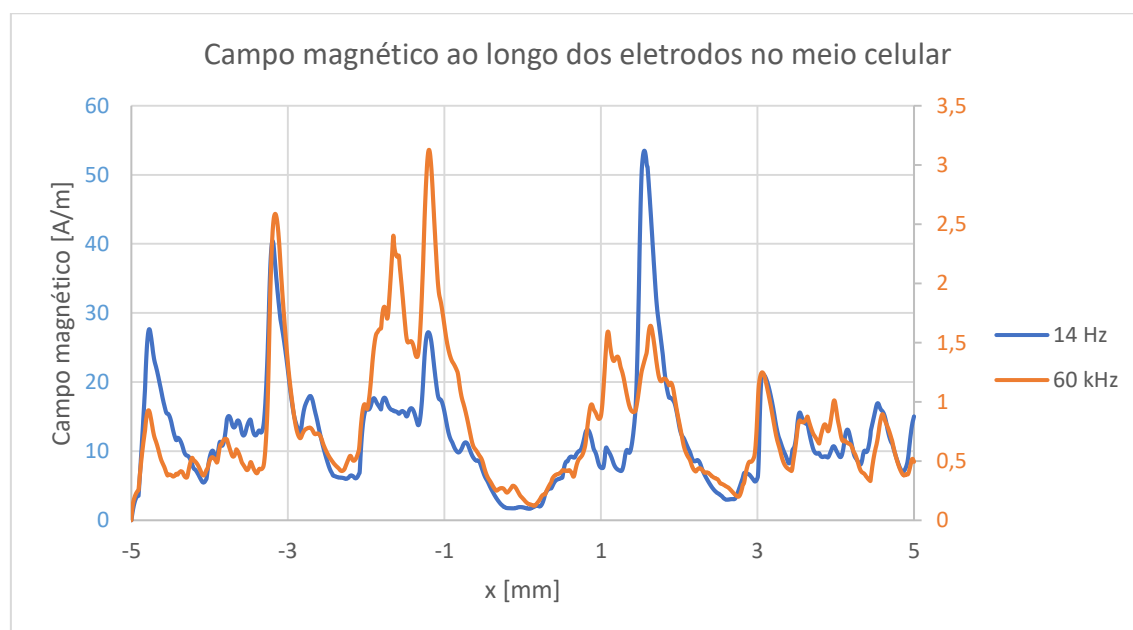


Figura 34 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado para BF e AF.

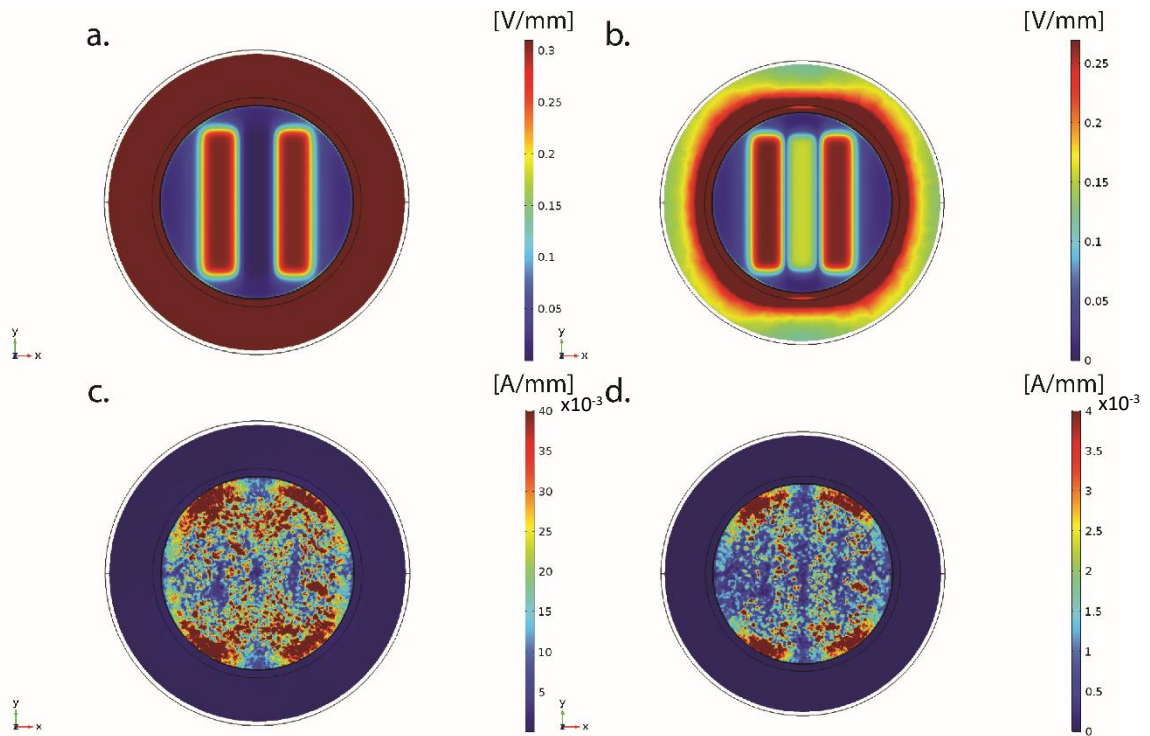


Figura 35 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície listrado aplicando a excitação: **a.** CE para BF; **b.** CE para AF; **c.** CM para BF; **d.** CE para AF.

5.2.2. Configuração em co-superfície interdigitado 1.0

A intensidade e dinâmica e dos estímulos de campo elétrico aplicados pela configuração interdigitado 1.0 é semelhante à encontrada na configuração em co-superfície listrada. Semelhantes distribuições também são observadas quando analisado o campo elétrico no meio celular ao longo de transversais $y = c^{te}$ a interfaces ânodo-cátodo. A forte heterogeneidade do estímulo magnético também é patente nesta configuração. Embora os campos magnéticos máximos também se concentrem nas interfaces eletrodo-eletrodo e eletrodo-placa de Petri já não se observa uma concentração dos mínimos sob o eletrodo-ânodo, esta distribuição aparece distinta devido ao próprio design dos eletrodos. Mais uma vez verifica-se que a heterogeneidade do campo magnético varia com a frequência, sendo os valores médios para 14 Hz 27 vezes superiores. Os estímulos do campo elétrico e magnético encontram-se em gamas osteogênicas [3], [55]. As Figuras 36 a 38 mostram, respectivamente, as intensidades, dinâmica e distribuições dos campos elétricos e magnéticos.

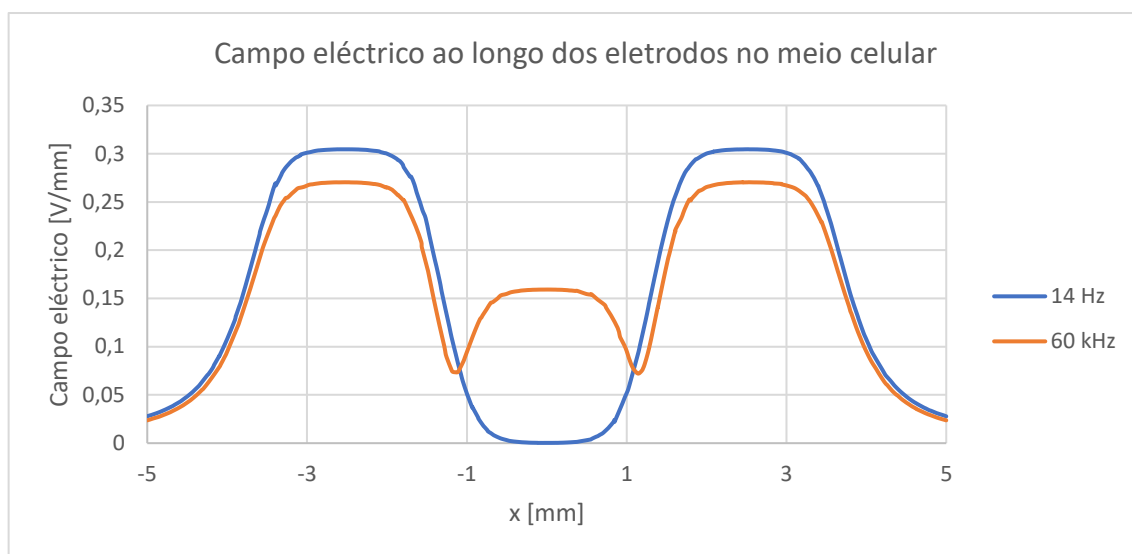


Figura 36 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 1.0 para AF e BF.

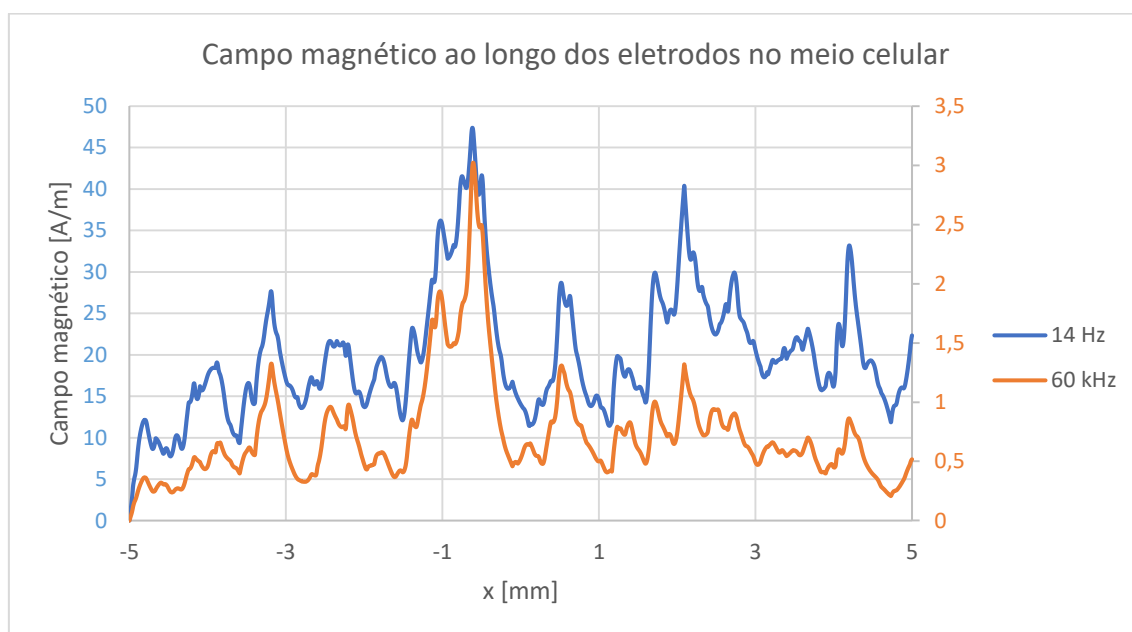


Figura 37 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 1.0 para BF e AF.

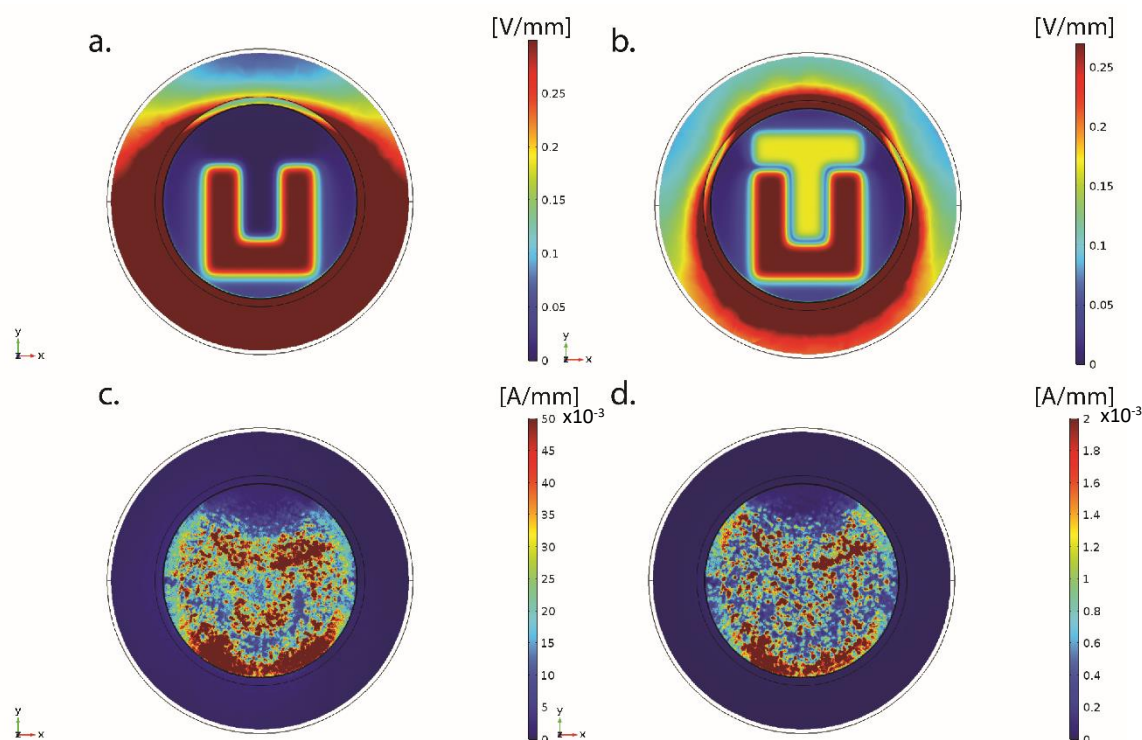


Figura 38 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 1.0 aplicando a excitação: **a.** CE para BF; **b.** CE para AF; **c.** CM para BF; **d.** CM para AF.

5.2.3. Configuração em co-superfície interdigitado 2.0

Comparando com a co-superfície interdigitada 1.0, a configuração interdigitada 2.0 introduz essencialmente alterações nas: (a) intensidades e distribuições do campo elétrico para elevadas frequências; (b) intensidades e distribuições do campo magnético para todas as frequências analisadas. É clara a influência da espessura do estimulador na dinâmica eletromagnética, como mostram as Figuras 39 a 41. Aparece agora uma forte correlação na distribuição do campo elétrico no estímulo de 14 Hz e 60 kHz, mas este estímulo tem sempre uma maior intensidade (é 2,3 vezes superior ao estímulo 14 Hz, o qual é muito semelhante ao encontrado para a configuração interdigitada 1.0). Apesar da forte irregularidade do campo magnético é possível observar um padrão para a sua distribuição: as maiores intensidades aparecem somente nas interfaces entre o eletrodo-ânodo e o eletrodo-cátodo, prolongando-se um pouco para os eletrodos-cátodo. O campo magnético continua a ser superior recorrendo-se a 14 Hz (7,5 vezes). Os estímulos elétricos e magnéticos encontram-se em gamas osteogénicas [3], [55].

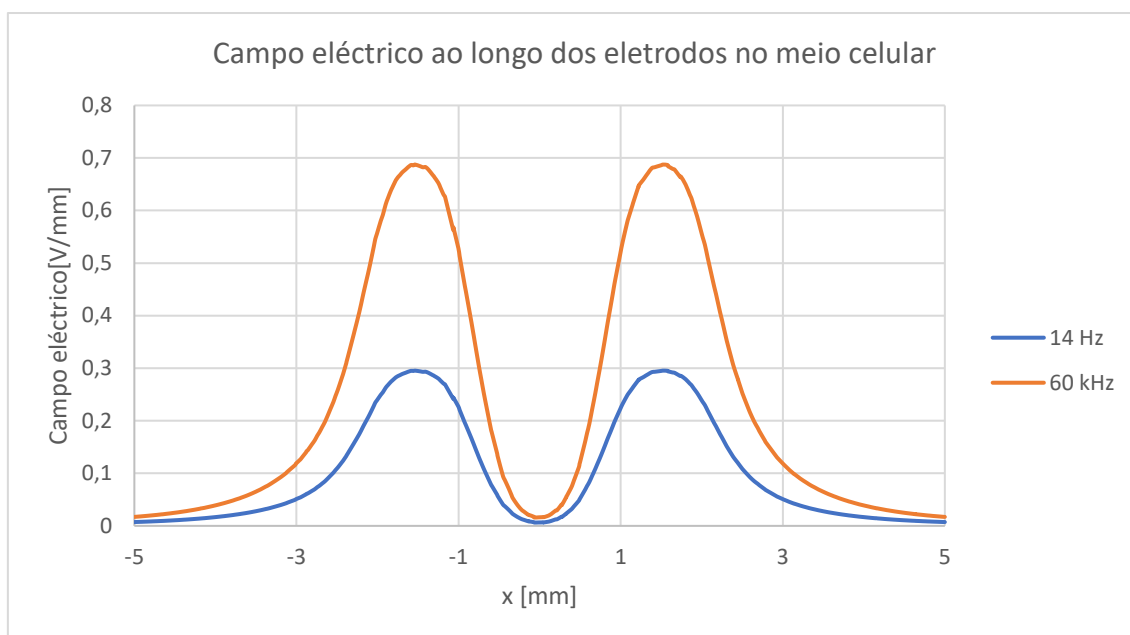


Figura 39 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 2.0 para BF e AF.

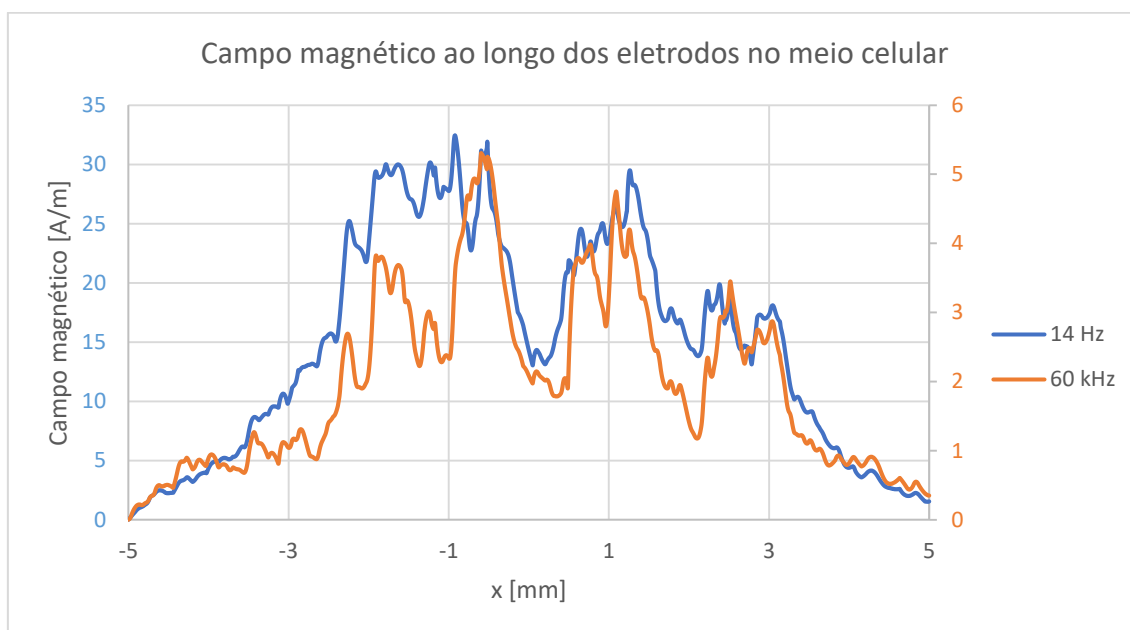


Figura 40 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície interdigitada 2.0 para BF e AF.

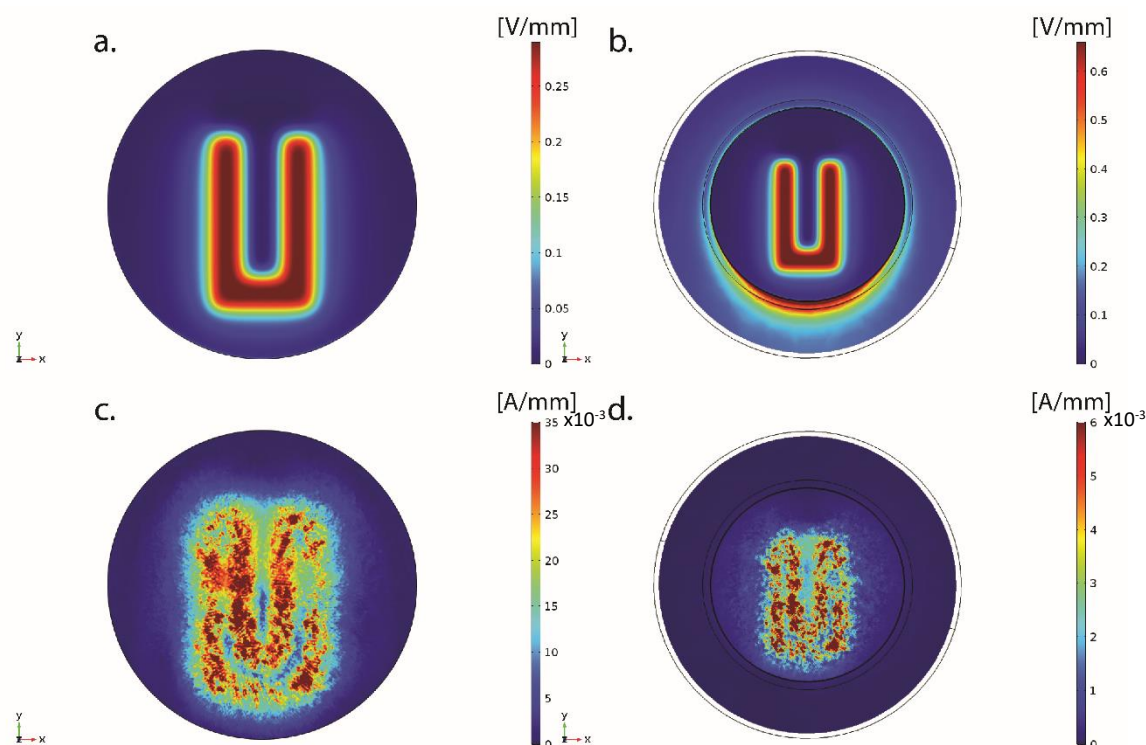


Figura 41 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 2.0 aplicando a excitação: **a.** CE para BF; **b.** CE para AF; **c.** CM para BF; **d.** CM para AF.

5.2.4. Configuração em co-superfície circular

Utilizando a configuração circular de elétrodos, é possível concluir novamente que: (i) a utilização de elevadas frequências não implica maiores intensidades de campo elétrico, (ii) baixas frequências produzem um campo magnético em media 95% superior. Foram encontradas distribuições e amplitudes similares às obtidas para as configurações em co-superfície listrada e interdigitada 1.0 para excitações de 14 Hz: máximos campos elétricos encontrados na região superior nos elétrodos-ânodo; mínimos campos elétricos na região superior aos elétrodos-ânodo. O máximo campo elétrico para excitações de 60 kHz também ocorre nos elétrodos-ânodo, mas os máximos são apenas locais nos elétrodos com maior diâmetro (aproximadamente 46% do máximo absoluto). Também nesta configuração é possível encontrar um padrão: (i) os maiores valores dos campos magnéticos surgem na interface entre os elétrodos-ânodo e o elétrodo-cátodo e (ii) A magnitude média para 14 Hz é 20 vezes superior. Os estímulos do campo elétrico e magnético encontram-se em gamas osteogénicas [3], [55]. As Figuras 42 a 44 mostram, respetivamente, as intensidades, dinâmica e distribuições dos campos elétricos e magnéticos.

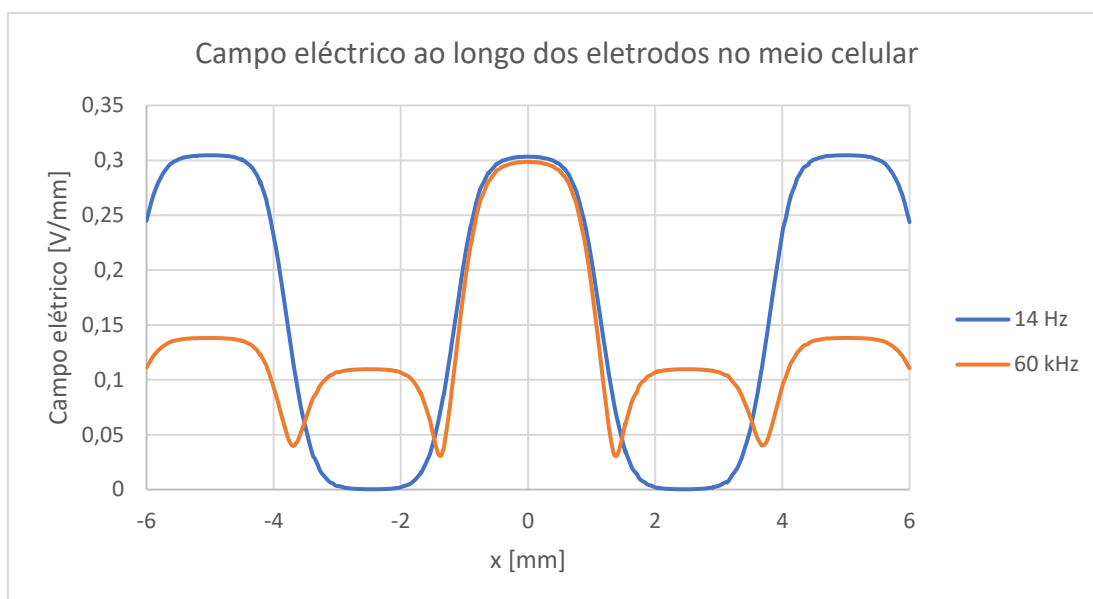


Figura 42 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,6]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície circular para BF e AF.

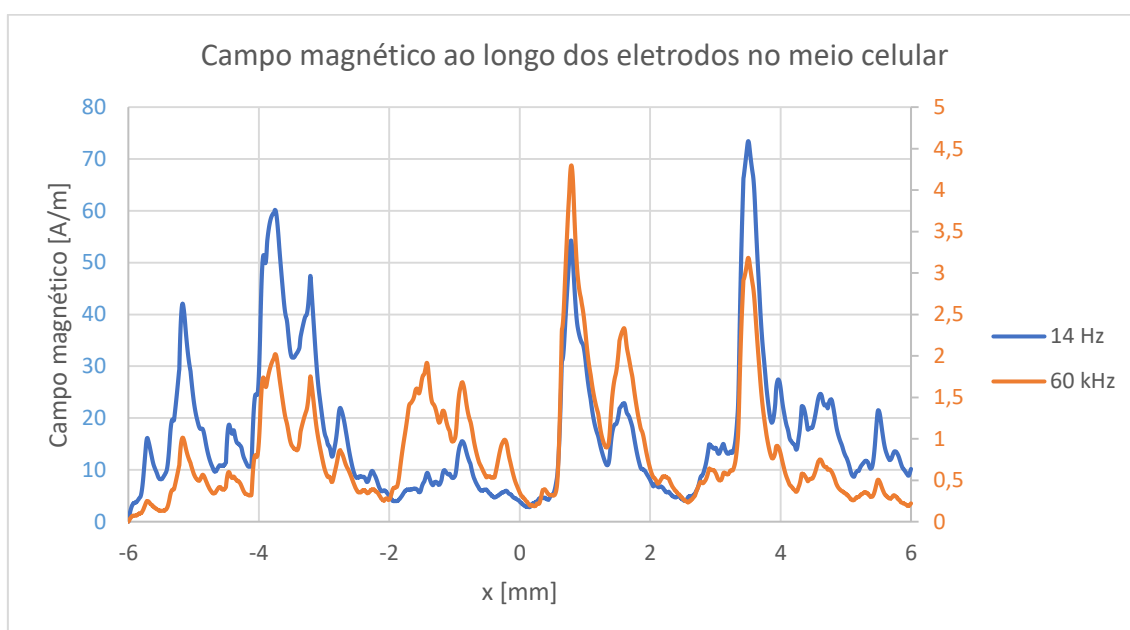


Figura 43 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,6]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração em co-superfície circular para BF e AF.

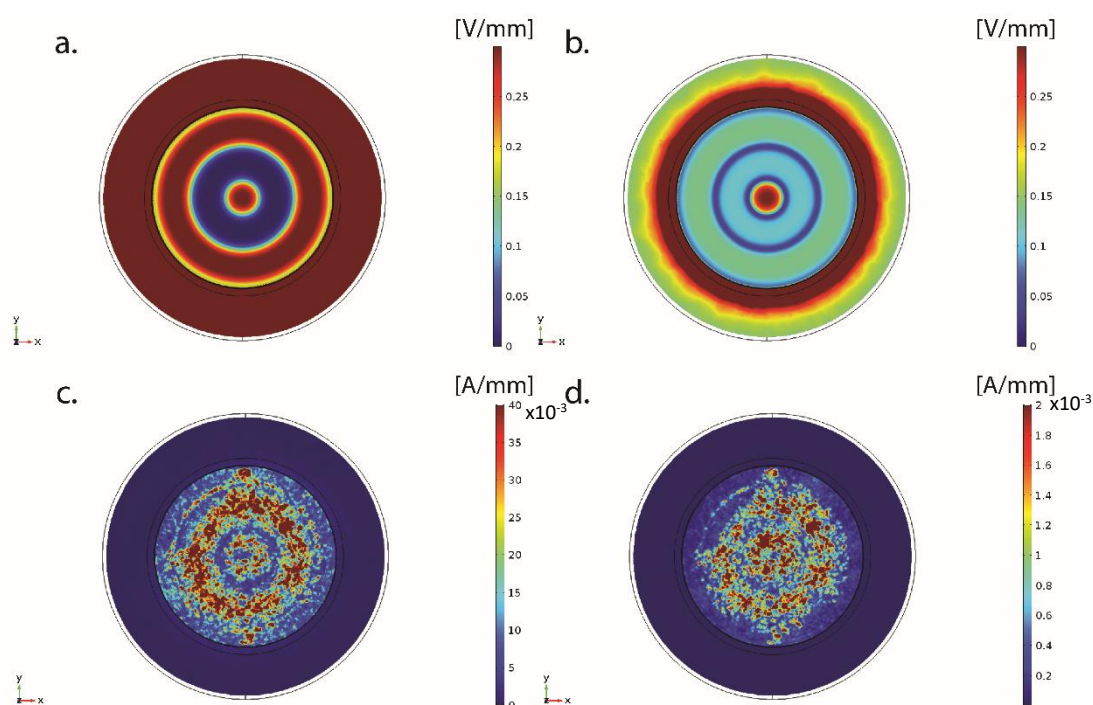


Figura 44 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície circular aplicando a excitação: **a.** CE para BF; **b.** CE para AF; **c.** CM para BF; **d.** CM para AF.

5.2.5. Configuração paralela

Como é expectável, foram encontradas distribuições homogêneas de campo elétrico ao longo das culturas celulares. O estímulo elétrico para 14 Hz tem intensidade similar ao máximo encontrado para essa frequência em todas as configurações anteriormente analisadas (em co-superfície listrada, interdigitada 1.0, interdigitada 2.0 e circular). Contudo, muito provavelmente é devido à variação da reactância global do sistema com o aumento da frequência [56], que menores campos elétricos são obtidos para a excitação de 60 kHz. A intensidade do estímulo elétrico para 60 kHz é aproximadamente 23% da intensidade do estímulo de 14 Hz. Espectável é também a distribuição do campo magnético pelo meio celular: o máximo encontra-se na interface entre o meio celular e a placa de Petri, o que implica uma estimulação celular residual por campos magnéticos (valores médios de $13,58 \times 10^{-3}$ A/mm para 14 Hz e $0,74 \times 10^{-3}$ A/mm para 60 kHz (13,6 vezes inferior). As Figuras 45 a 47 mostram as intensidades, dinâmica e distribuições dos campos elétricos e magnéticos.

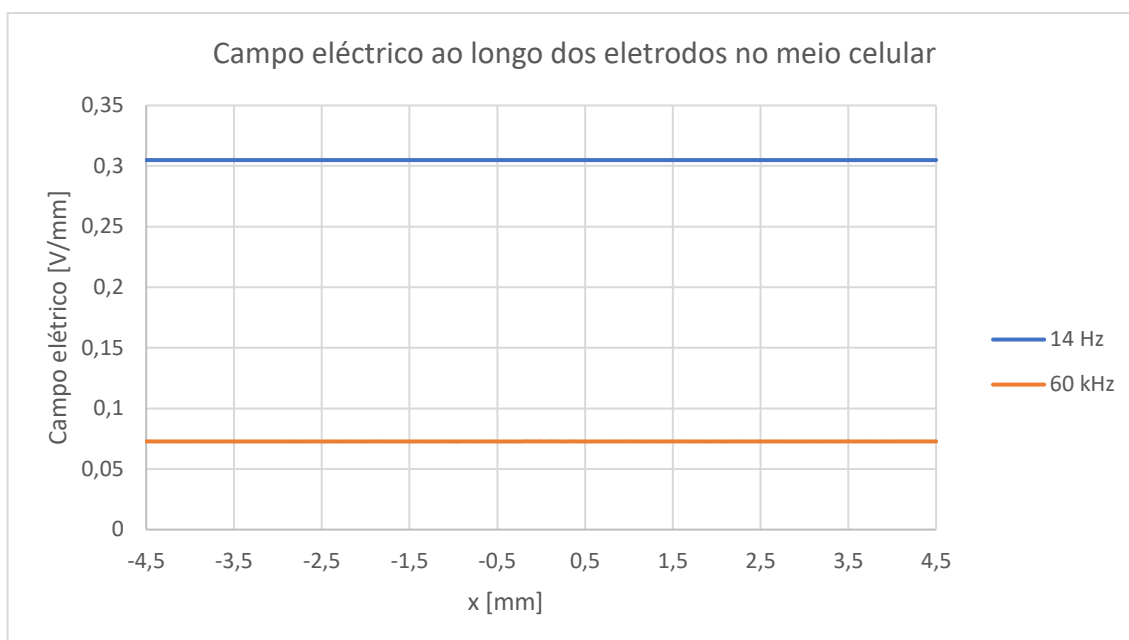


Figura 45 - CE ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-5,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração paralela para BF e AF.

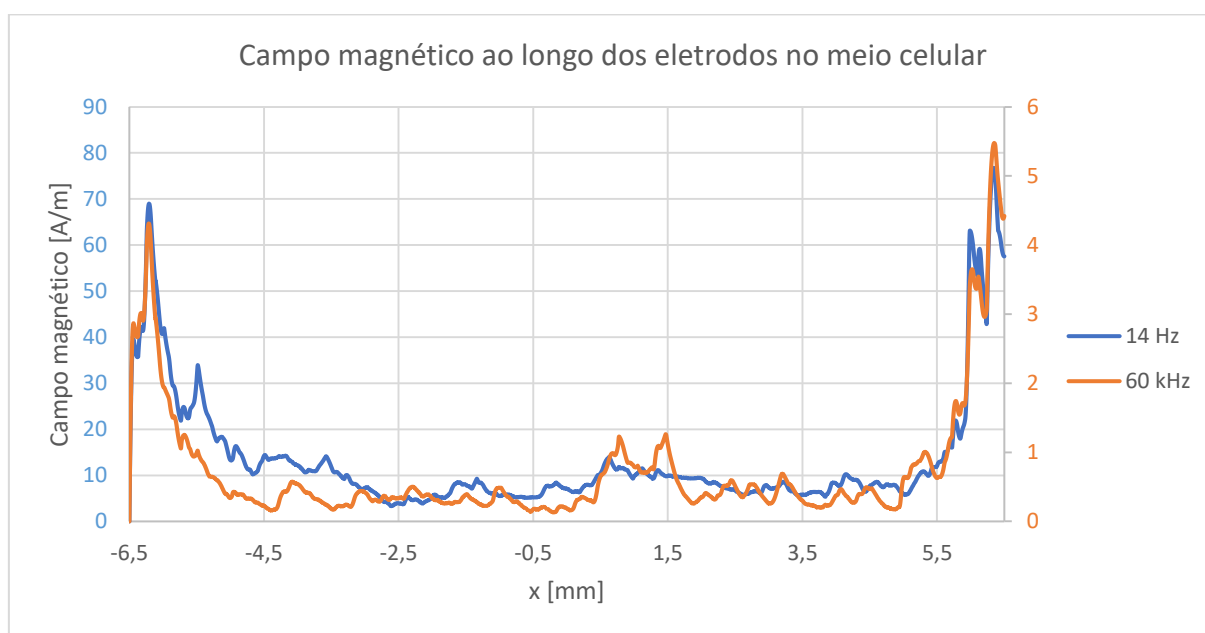


Figura 46 - CM ao longo meio celular ($y=0$, $x=[-6,5,6,5]$ mm, $z=0,51$ mm) para a configuração paralela para BF e AF.

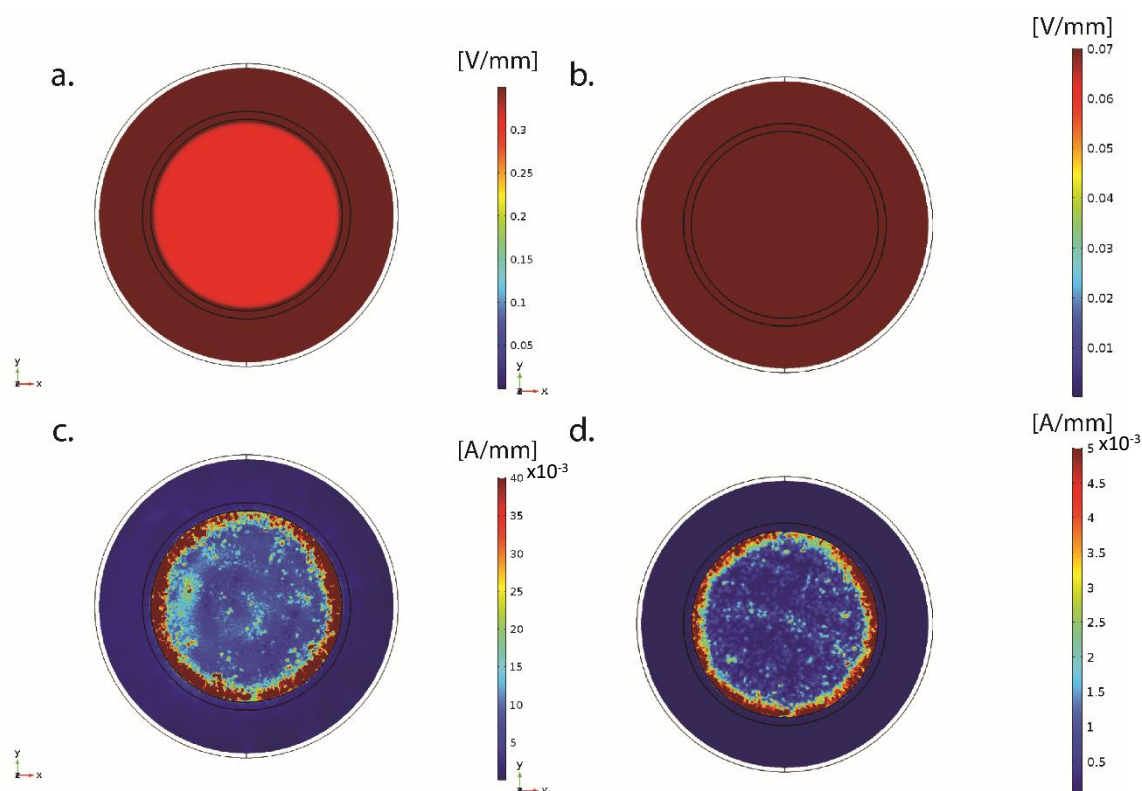


Figura 47 - Distribuição do CE e CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração paralela aplicando a excitação: **a.** CE para BF; **b.** CE para AF; **c.** CM para BF; **d.** CM para AF.

5.3. Análise comparativa entre configurações

Importa agora realizar uma comparação global do campo elétrico e magnético aplicado pelas diversas configurações. As Figuras 48 e 49 apresentam, respetivamente, todos os campos elétricos ao longo da linha $y=0$ mm ($z=0,51$ mm). Comportamentos, distribuições e intensidades similares do campo elétrico são destacados pelas configurações em co-superfície listrada e interdigitada 1.0. Na configuração circular o campo elétrico máximo para excitações de 14 Hz também ocorre nos elétrodos-ânodo, mas os máximos são apenas locais nos elétrodos com maior diâmetro (aproximadamente 46% do máximo absoluto). A configuração interdigitada 2.0 apresenta apenas as máximas intensidades campo elétrico em diferentes regiões, uma vez que o posicionamento dos seus elétrodos é ligeiramente diferente do posicionamento dos elétrodos da configuração interdigitada 1.0. O mesmo não se pode afirmar da análise aos campos elétricos para excitações de 60 kHz. A configuração interdigitada 2.0 consegue aplicar os máximos e mínimos campos elétricos: os máximos são (pelo menos) 2,3 vezes superiores ao aplicado pelas restantes configurações, mas o mínimo apresenta um campo elétrico quase nulo. Contudo, é fato que o campo elétrico para 60 kHz nunca se anula ao longo da cultura celular para as configurações co-superfície listrada, interdigitada 1.0 e circular. A influência da espessura no desempenho dos estimuladores também se verifica na forte heterogeneidade da configuração interdigitada 2.0. Embora apenas se possa afirmar a homogeneidade da configuração paralela, o nível de heterogeneidade das configurações em co-superfície listrada, interdigitada 1.0 e circular não são tão acentuadas. Pequenas diferenças foram observadas entre as co-superfície listrada e interdigitada 1.0, cerca de 2,4% para 60 kHz e 4,7% para 14 Hz. A configuração paralela

é a que promove uma menor estimulação: o valor médio do campo eléctrico é sempre inferior a 0,026 V/mm (-26%) do aplicado pelas restantes configurações.

Os campos magnéticos encontram-se representados graficamente nas Figuras 50 e 51. Em todos os casos o campo magnético apresenta um comportamento de heterogeneidade e apesar da sua distribuição irregular é possível encontrar um padrão para a distribuição deste: as maiores intensidades aparecem somente nas interfaces entre o eléctrodo-ânodo e o eléctrodo-cátodo, eléctrodos-placa de Petri e nas arestas dos eléctrodos. As maiores magnitudes, em média, de campo magnético para baixas frequências correspondem às configurações em co-superfície interdigitada 1.0 e circular. Em relação às altas frequências foi a configuração em co-superfície interdigitada 2.0 que obteve os valores médios de campo magnético mais elevados, todas as outras apresentam valores bastante próximos. No geral, em média os valores para 14 Hz são 15 vezes superiores.

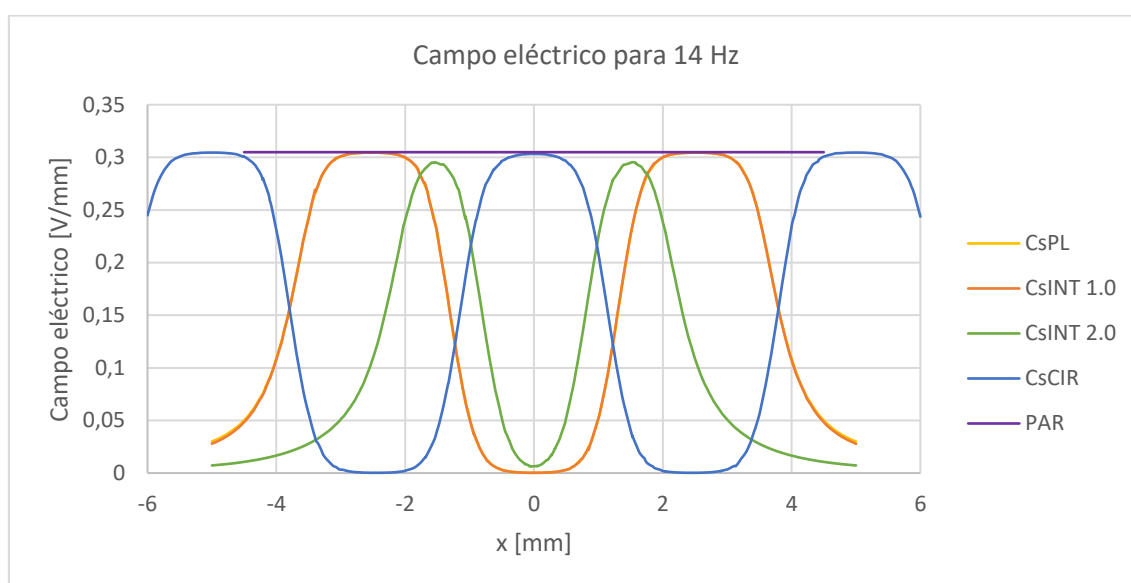


Figura 48 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação BF.

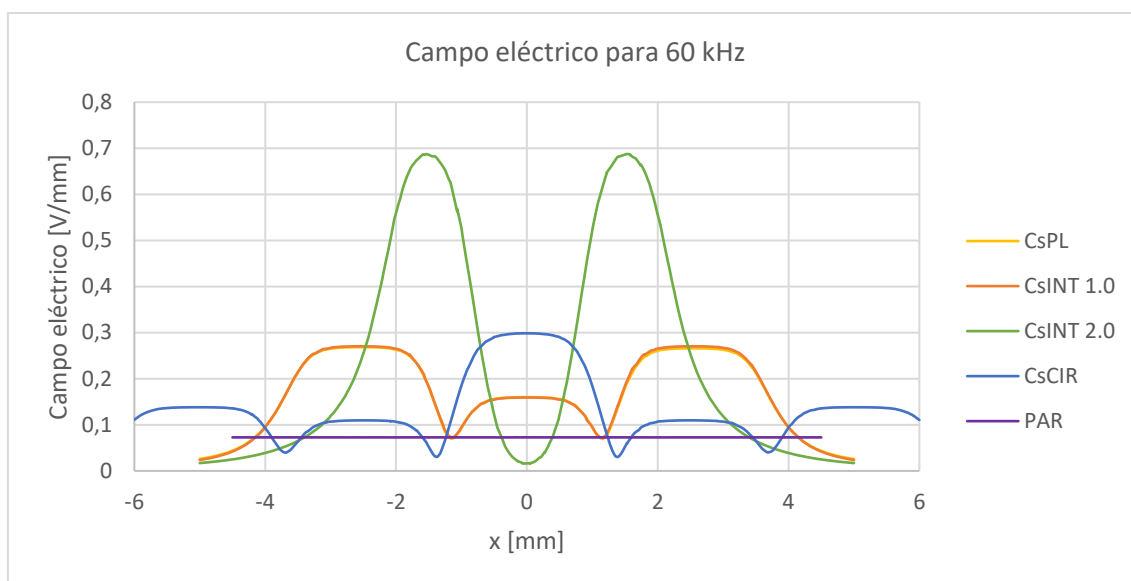


Figura 49 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação AF.

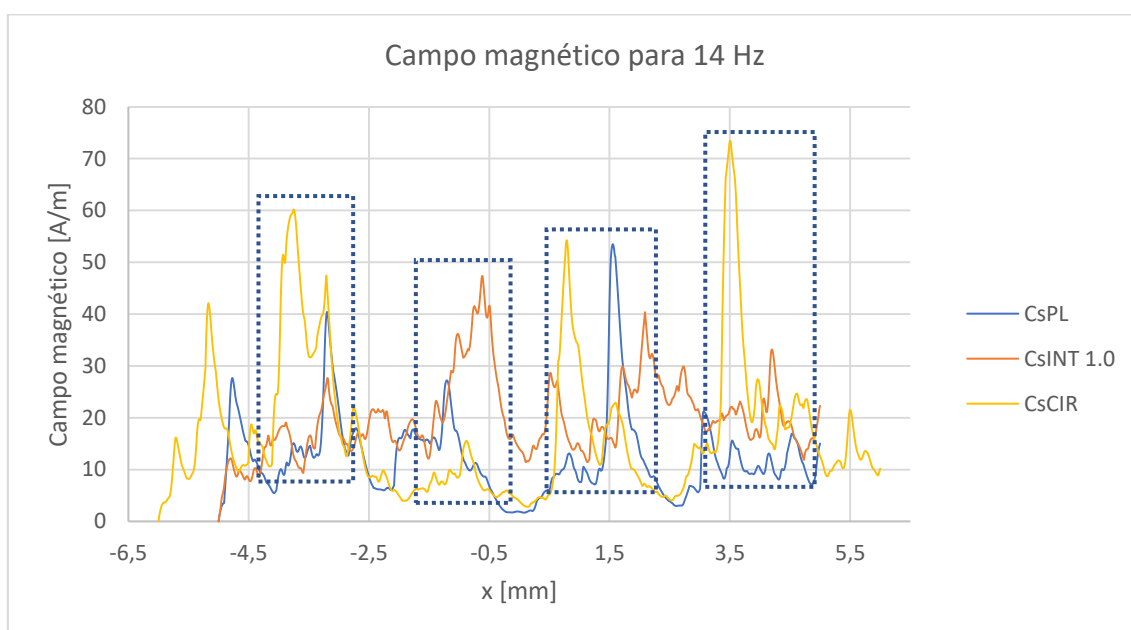


Figura 50 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação BF.

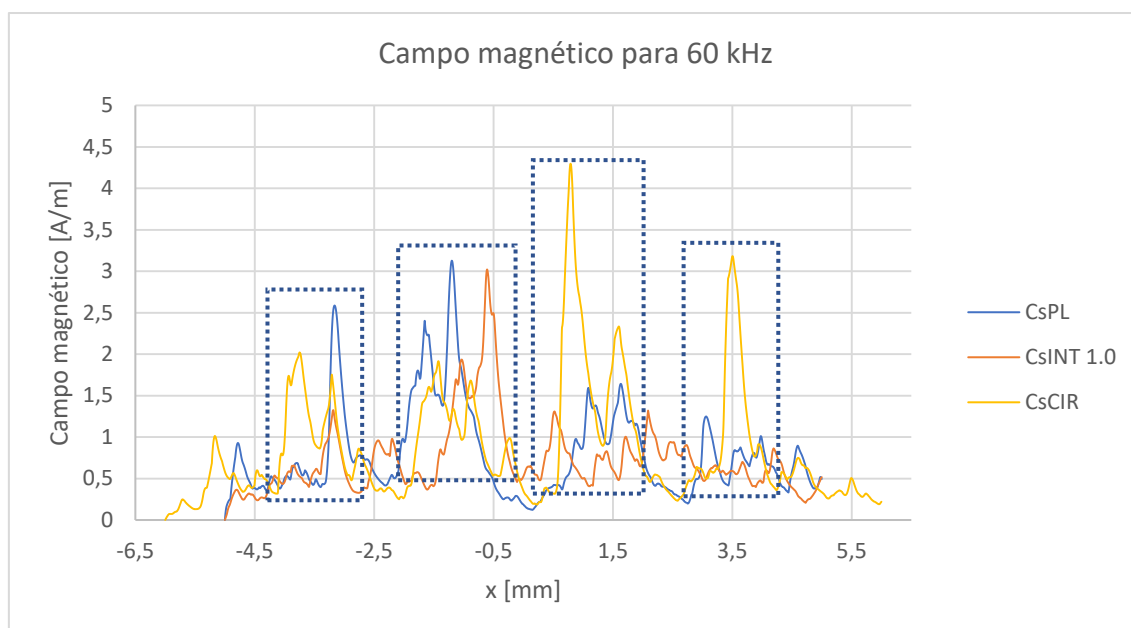


Figura 51 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores aplicando a excitação AF.

5.4. Influência da espessura das configurações

Após se verificar a influência da espessura na configuração em co-superfície interdigitada quando se recorreu a 60 kHz, esta medida foi alterada para as restantes configurações (padrão listrado, interdigitado 1.0 e circular) de 1mm para 0,1 mm, passando a designarem-se de padrão listrado 2.0, interdigitado 1.5 e circular 2.0.

O campo elétrico para 14 Hz não se alterou, como já seria de esperar, já para 60 kHz, em todas as configurações é possível observar grandes diferenças: (i) os valores máximos aumentaram em média 2,3 vezes, (ii) sob os elétrodos-cátodo o campo passa a ser quase nulo, deixando de existir os máximos locais nesses pontos, anteriormente verificados. Resumindo, o comportamento de heterogeneidade entre estímulos de 14 Hz e 60 kHz passa a ser semelhante para todas as configurações, sendo que para as altas frequências os valores máximos são superiores. O campo magnético passa a apresentar um padrão mais definido, os maiores campos magnéticos surgem na interface entre os elétrodos-ânodo e o elétrodo-cátodo e nas arestas exteriores dos elétrodos, a configuração onde melhor se observa tal fenómeno é em co-superfície listrada. Comparando com os modelos de maior espessura verificou-se um aumento do campo magnético para 14 Hz de 2,5 vezes nas configurações em co-superfície listrada e circular, para 60 kHz apenas nesta primeira e na interdigitada 1.5 regista-se um aumento de 2,8 vezes, na circular o campo diminuiu. Os estímulos elétricos e magnéticos encontram-se em gamas osteogénicas [3], [55]. As Figuras 52 a 58 mostram as intensidades, dinâmica e distribuições dos campos elétricos e magnéticos.



Figura 52 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação BF.



Figura 53 - CE no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação AF.

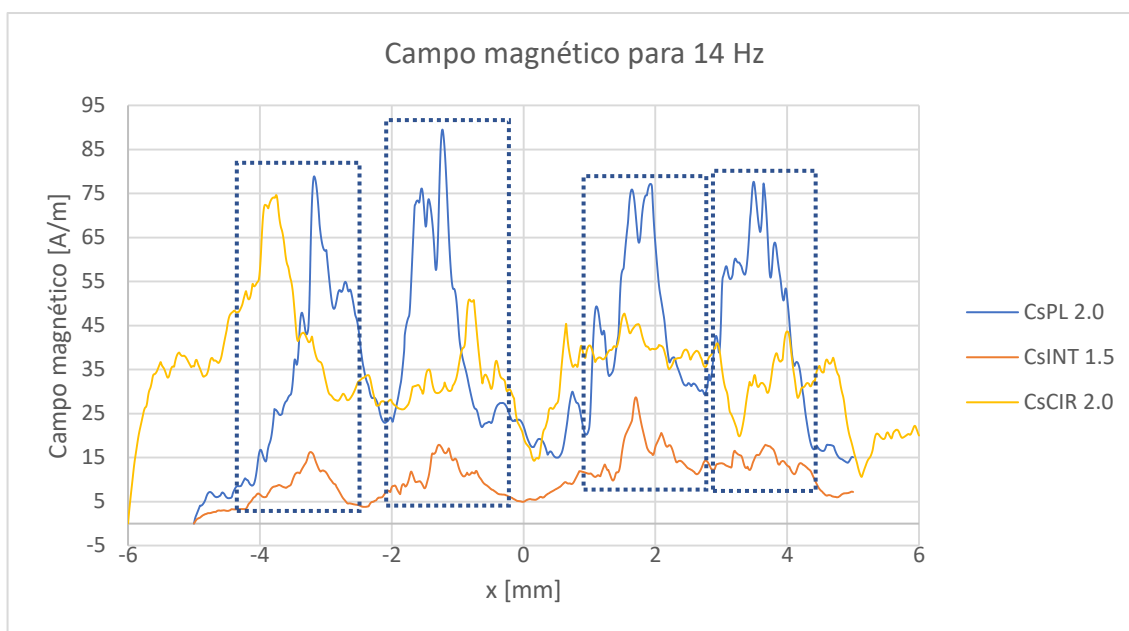


Figura 54 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação BF.

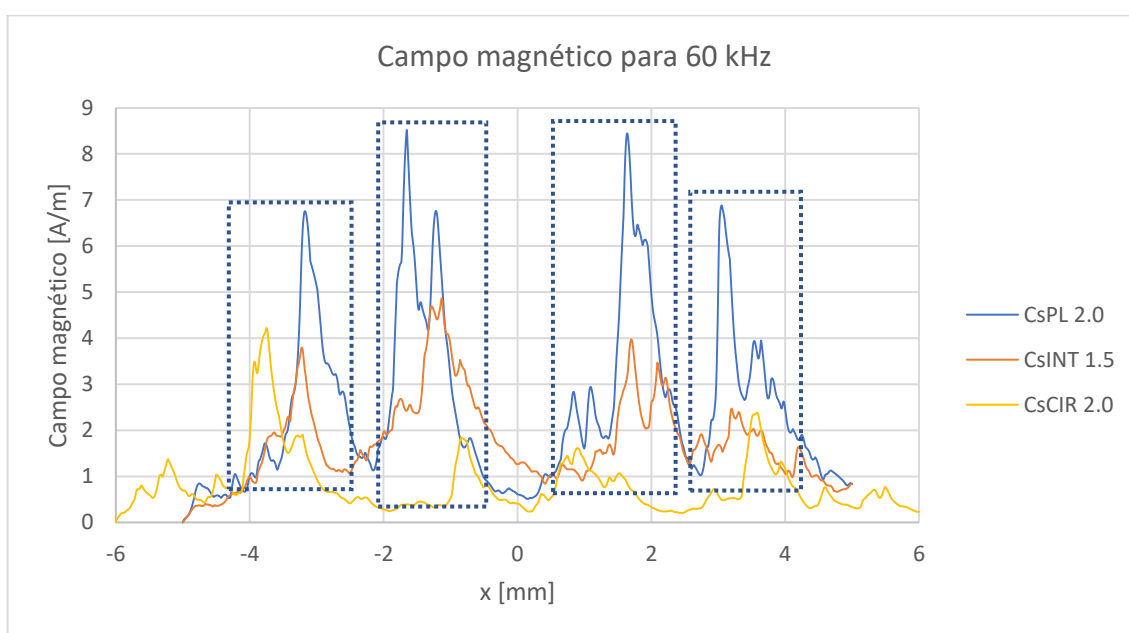


Figura 55 - CM no meio celular aplicado pelos estimuladores de espessura 0,1mm aplicando a excitação AF.

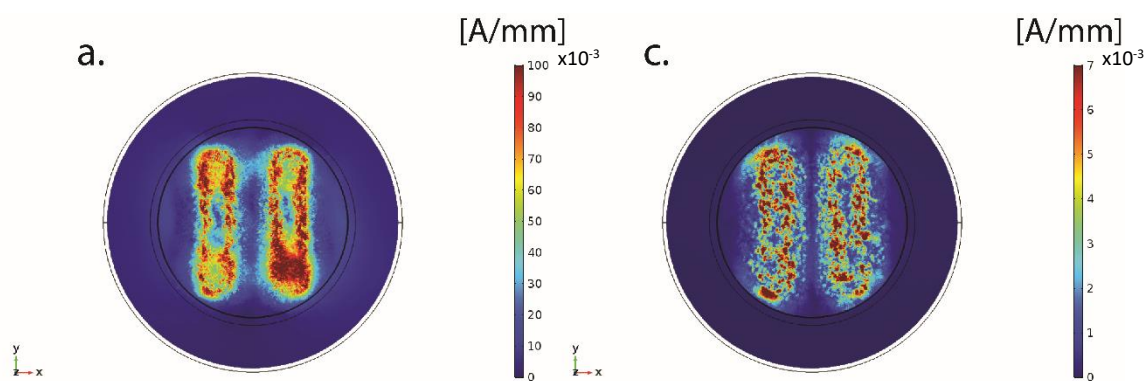


Figura 56 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície padrão listrado aplicando a excitação: **a.** CM para BF; **b.** CM para AF.

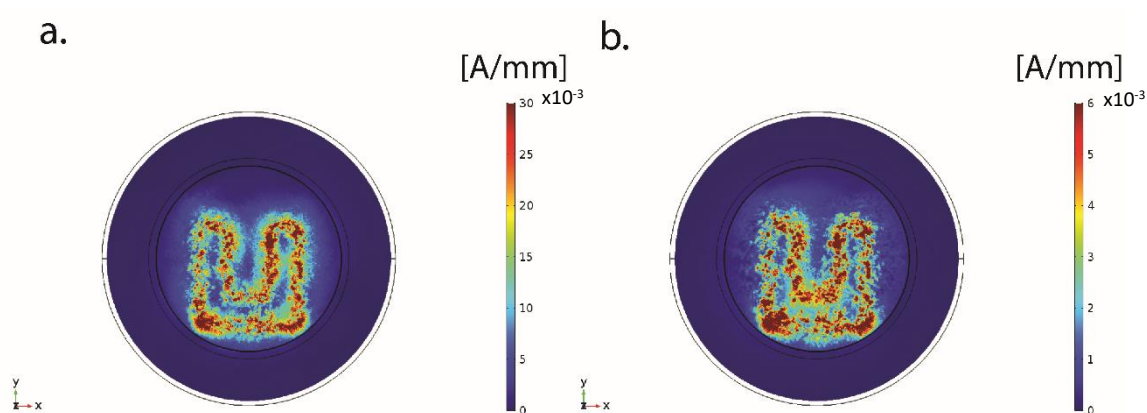


Figura 57 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície interdigitada 1.5 aplicando a excitação: **a.** CM para BF; **b.** CM para AF.

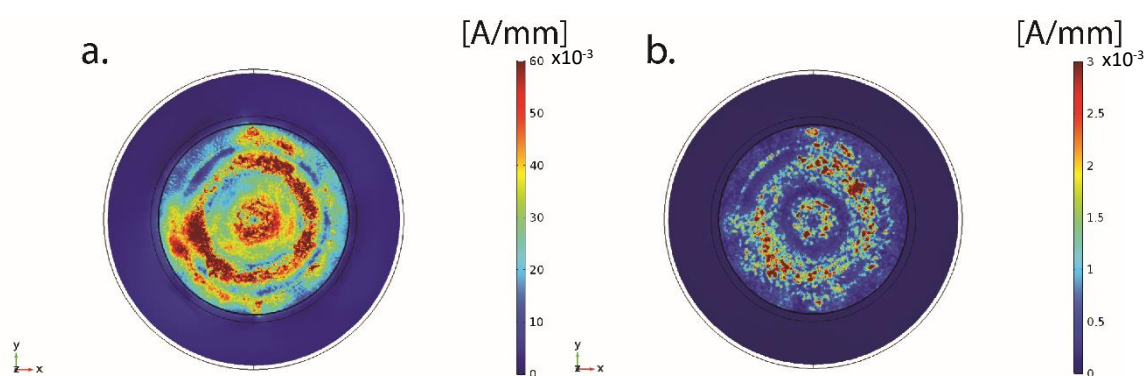


Figura 58 - Distribuição CM no meio celular ($z=0,51$ mm) para configuração em co-superfície circular aplicando a excitação: **a.** CM para BF; **b.** CM para AF.

5.5. Influência da excitação aos elétrodos

De forma a se analisar o impacto do potencial elétrico aplicado aos elétrodos nos estímulos do campo elétrico, variou-se a amplitude deste potencial (parâmetro K_{ex}) entre 2 V e 10 V. Não se registaram alterações na dinâmica, mas tão somente variações lineares na magnitude do campo elétrico, de acordo com as Figuras no anexo D. Declives similares foram observados para as configurações em co-superfície listrado, interdigitado 1.0 e circular, o que implicou ganhos de magnitude do campo elétrico entre 5 a 6 vezes entre 2 V e 10 V. O maior declive (0,14) foi registado para o co-superfície interdigitado 2.0 para 60 kHz, verificando-se que o campo elétrico aumentou aproximadamente 4,6 vezes entre a menor e maior excitação. O menor declive (0,015) corresponde à configuração paralela para 60 kHz, embora o campo elétrico aumente cerca de 9 vezes na gama de excitações analisada. Em média, para ambas as frequências o declive é de 0,062 (Figura 59).

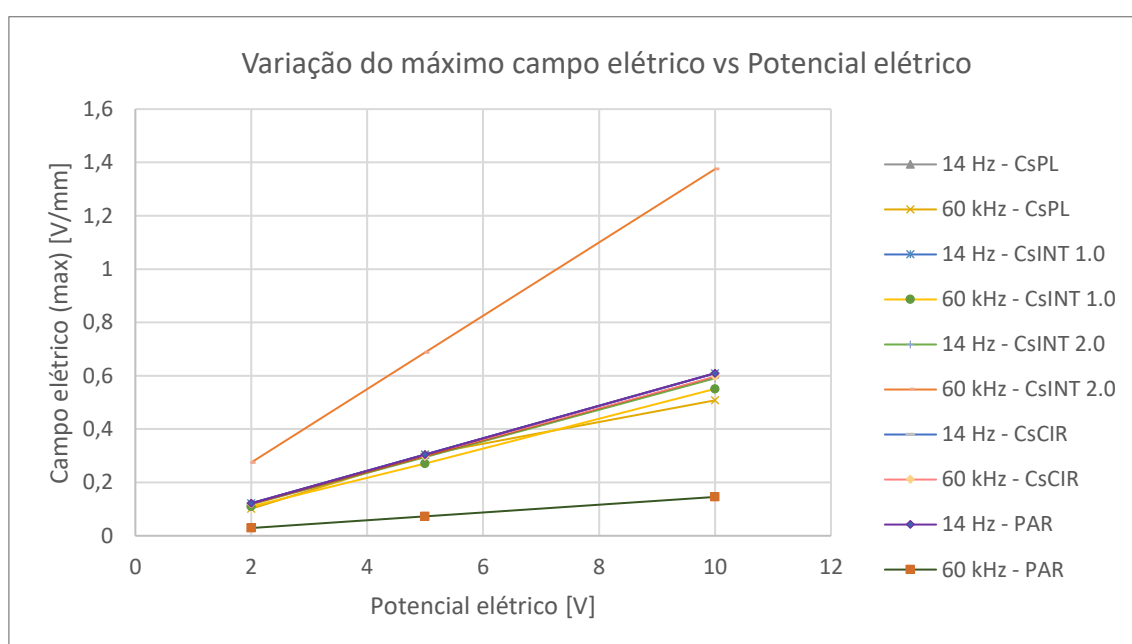


Figura 59 - Variação do máximo do CE no meio celular em função da amplitude da excitação aplicada aos elétrodos ($x = \text{max. CE}$, $y = 0 \text{ mm}$, $z = 0,51 \text{ mm}$).

Em relação à variação do campo magnético com a variação da amplitude da excitação dos elétrodos, observaram variações quase lineares na magnitude do campo magnético, de acordo com as Figuras anexo D. Para excitações de 14 Hz verificou-se maiores declives (média 3,12) do que para 60 kHz (média de 0,2). Todos os declives, em cada frequência, verificaram-se bastante próximos (Figura 60).

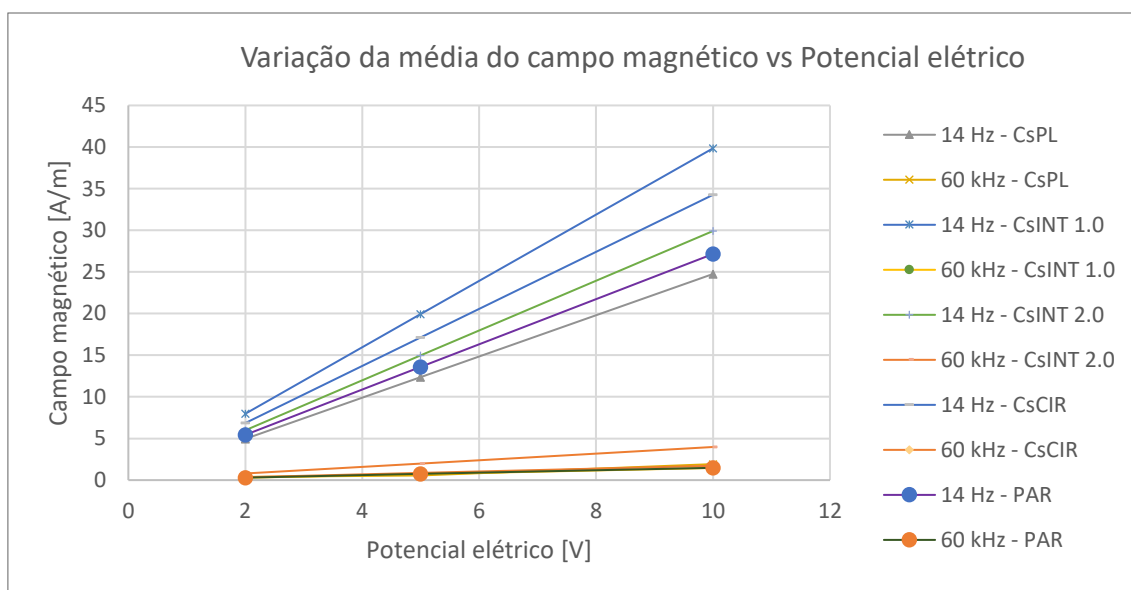


Figura 60 - Variação da média do CM no meio celular em função da amplitude da excitação aplicada aos elétrodo ($y=0\text{ mm}$, $z=0,51\text{ mm}$).

5.6. Validação dos modelos simplificados

Finalmente, analisou-se a escalabilidade destes resultados para modelos com maior número de elétrodo. Realizou-se, por isso, uma comparação entre os campos eletromagnéticos dos modelos simplificados e os completos. Uma única alteração foi introduzida nos modelos completos em relação aos modelos simplificados: utilizou-se a malha customizada 2 para os modelos completos (número total de elementos: 886574). As condições consideradas para a simulação dos modelos simplificados foram mantidas. As Figuras 85 a 98 no anexo E mostram a distribuição do campo elétrico dos modelos simplificados e completos. Pode-se concluir que similares campos elétricos são obtidos para excitações de 14 Hz, independentemente da configuração. Em relação à estimulação de 60 kHz, o mesmo apenas pode ser afirmado para a configurações de espessura reduzida. Nestes modelos completos é patente um *offset* negativo no campo elétrico ao longo de toda a cultura na configuração listrada e interdigitada 1.0 (22% e 27%, respetivamente, do campo elétrico do modelo simplificado), e uma atenuação do máximo campo elétrico na configuração circular (12% e 6%, respetivamente, do campo elétrico do modelo simplificado). Verifica-se, assim, somente a replicabilidade dos resultados do modelo simplificado para baixas frequências (para outras configurações com mais elétrodo) e para configuração com elétrodo de pequenas espessuras.

Capítulo 5

6. Discussão e conclusões

Neste estudo foi analisado os estímulos de campo elétrico e magnético que podem ser aplicados em testes *in vitro* em meios celulares por vários sistemas de estimulação capacitiva, a saber, em co-superfície listrado, co-superfície interdigitado, co-superfície circular e paralelo. A relevância deste estudo prende-se com a necessidade de se identificar as relações entre excitação exterior (aos elétrodos), estímulos, campos eletromagnéticos e propriedades osteogénicas, para assim se desenvolverem terapias biofísicas personalizadas. Os resultados alcançados mostram que:

- Os estímulos aplicados por todas as configurações analisadas estão numa gama de amplitudes que já foram identificadas como osteogénicas pela literatura;
- O estado de confluência não altera significativamente os estímulos elétricos aplicados ao meio celular.
- Configurações de elétrodos com pequenas espessuras aplicam estímulos elétricos de maior magnitude em altas frequências.
- A replicabilidade dos campos elétricos é possível para estímulos de baixa frequência, mas é independente dos sistemas capacitivos estudados.
- A replicabilidade dos campos elétricos também é possível em altas frequências, mas para estimuladores com elétrodos de pequena espessura.
- Ocorrem fenómenos nas altas frequências que impedem o uso de modelos simplificados para a análise da dinâmica eletromagnética.
- Recorrendo a 60 kHz o campo elétrico não se anula sob os elétrodos-ânodo, exceto para configurações com elétrodos de espessura reduzida;
- Para altas frequências, os máximos locais de campo elétrico sob os elétrodos-ânodo são 48% inferiores em relação ao máximo sob o eléctrodo-cátodo;
- Os valores máximos de campo magnético encontram-se sempre entre as interfaces dos elétrodos e se suficientemente próximos entre as interfaces eléctrodo-placa de Petri;
- Com a diminuição da espessura verifica-se um padrão mais definindo do campo magnético nas interfaces dos elétrodos-cátodo e elétrodos-ânodo;
- A magnitude dos campos magnéticos diminui com o aumento da frequência (-93,5% em média);
- A magnitude dos estímulos varia proporcionalmente com a amplitude da excitação aplicada aos elétrodos.

Nos estudos descritos na revisão da literatura, (resumidos em tabelas no anexo A) encontra-se uma vasta gama de valores da intensidade do campo elétrico no meio celular que promoveram a proliferação, entre 1×10^{-8} V/mm e 6 V/mm [27]–[29]. Para a promoção da fase de diferenciação registaram-se resultados mais promissores para 0,01 V/mm, 6 V/mm e 0,3 V/mm [3], [27], [32]. Todos os valores obtidos neste estudo provaram-se eficientes para o

objetivo pretendido, e poderão ser manipulados para aumentar ou diminuir de acordo com a finalidade variando apenas a amplitude do sinal aplicado aos elétrodos. Para todas configurações é possível adaptar os valores de frequência ou amplitude aplicada nos elétrodos para se obter valores ótimos de excitação elétrica no meio celular.

De referir novamente que são muito poucos os estudos que se focam nos campos presentes no meio celular, pelo que é difícil relacionar os diferentes resultados entre si, pelo que o âmbito deste trabalho serve também para criar uma referência de como as magnitudes destes campos variam e qual as suas intensidades variando diferentes parâmetros, desde a configuração dos elétrodos e as suas dimensões, como a frequência e amplitude do estímulo exterior.

Por enquanto ainda não é possível afirmar a melhor configuração de elétrodos a adotar, ou os melhores parâmetros do estímulo a aplicar, para a ativação dos principais marcadores da maturação dos osteoblastos. Mas uma vez que já existe uma base de dados com informação das magnitudes dos campos eletromagnéticos presentes no meio celular, a sua distribuição e como estes poderão variar conforme os diferentes estímulos aplicados, realizando futuros ensaios *in vitro* e cruzando a resposta biológica com tais dados será possível concluir com mais precisão quais os melhores parâmetros e configurações que poderão vir a servir de atuadores capacitivos num implante instrumentado ativo.

Bibliografia

- [1] A. J. Carr *et al.*, “Knee replacement,” *Lancet*, vol. 379, no. 9823, pp. 1331–1340, 2012.
- [2] L. March *et al.*, “Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders,” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 28, no. 3, pp. 353–366, 2014.
- [3] M. P. Soares dos Santos *et al.*, “New cosurface capacitive stimulators for the development of active osseointegrative implantable devices,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. February, p. 30231, 2016.
- [4] S. Kurtz, “Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030,” *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 89, no. 4, p. 780, 2007.
- [5] R. Pivec, A. J. Johnson, S. C. Mears, and M. A. Mont, “Hip arthroplasty,” *Lancet*, vol. 380, no. 9855, pp. 1768–1777, 2012.
- [6] J. N. Torrao, M. P. Dos Santos, and J. A. Ferreira, “Instrumented knee joint implants: innovations and promising concepts,” *Expert Rev Med Devices*, vol. 12, no. 5, pp. 571–584, 2015.
- [7] G. Labek, M. Thaler, W. Janda, M. Agreiter, and B. Stockl, “Revision rates after total joint replacement: Cumulative results from worldwide joint register datasets,” *Bone Joint J.*, vol. 93–B, no. 3, pp. 293–297, 2011.
- [8] C. Pabinger and A. Geissler, “Utilization rates of hip arthroplasty in OECD countries,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 22, no. 6, pp. 734–741, 2014.
- [9] S. M. Kurtz *et al.*, “International survey of primary and revision total knee replacement,” *Int. Orthop.*, vol. 35, no. 12, pp. 1783–1789, 2011.
- [10] S. M. Kurtz, E. Lau, K. Ong, K. Zhao, M. Kelly, and K. J. Bozic, “Future young patient demand for primary and revision joint replacement: National projections from 2010 to 2030,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 467, no. 10, pp. 2606–2612, 2009.
- [11] A. Troelsen, E. Malchau, N. Sillesen, and H. Malchau, “A review of current fixation use and registry outcomes in total hip arthroplasty: The uncemented paradox hip,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 471, no. 7, pp. 2052–2059, 2013.
- [12] D. R. Sumner, “Long-term implant fixation and stress-shielding in total hip replacement,” *J. Biomech.*, vol. 48, no. 5, pp. 797–800, 2015.
- [13] V. Goriainov, R. Cook, J. M. Latham, D. G. Dunlop, and R. O. C. Oreffo, “Bone and metal: An orthopaedic perspective on osseointegration of metals,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 10, pp. 4043–4057, 2014.
- [14] M. P. S. dos Santos *et al.*, “Instrumented hip joint replacements, femoral replacements and femoral fracture stabilizers,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 11, no. 6, pp. 617–635, 2014.
- [15] P. G. Coelho *et al.*, “Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: A bone histological, gene expression, and nanomechanical study,” *Bone*, vol. 65, pp. 25–32, 2014.
- [16] G. Ryan, A. Pandit, and D. P. Apatsidis, “Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 13, pp. 2651–2670, 2006.

- [17] J. A. Simões and A. T. Marques, "Design of a composite hip femoral prosthesis," *Mater. Des.*, vol. 26, no. 5, pp. 391–401, 2005.
- [18] M. Griffin and A. Bayat, "Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence.," *Eplasty*, vol. 11, pp. 303–353, 2011.
- [19] I. S. Kim *et al.*, "Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1763, no. 9, pp. 907–916, 2006.
- [20] M. Hronik-Tupaj and D. L. Kaplan, "A Review of the Responses of Two- and Three-Dimensional Engineered Tissues to Electric Fields," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, no. 3, pp. 167–180, 2012.
- [21] M. Hronik-Tupaj, W. L. Rice, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, "Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields," *Biomed. Eng. Online*, vol. 10, no. 1, p. 9, 2011.
- [22] M. P. Soares dos Santos, "A new concept model for instrumented active orthopaedic implants," Universidade de Aveiro, 2016.
- [23] H. Ozawa, E. Abe, Y. Shibasaki, T. Fukuhara, and T. Suda, "Electric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) by a mechanism involving calcium ions.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 483, pp. 477–83, 1989.
- [24] R. J. Fitzsimmons, D. D. Strong, S. Mohan, and D. J. Baylink, "Low-amplitude, low-frequency electric field-stimulated bone cell proliferation may in part be mediated by increased IGF-II release," *J. Cell. Physiol.*, vol. 150, no. 1, pp. 84–89, 1992.
- [25] H. Zhuang, W. Wang, R. M. Seldes, A. D. Tahernia, H. Fan, and C. T. Brighton, "Electrical Stimulation Induces the Level of TGF- β 1 mRNA in Osteoblastic Cells by a Mechanism Involving Calcium/Calmodulin Pathway," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 237, no. 2, pp. 225–229, 1997.
- [26] C. T. Brighton, W. Wang, R. Seldes, G. Zhang, and S. R. Pollack, "Signal transduction in electrically stimulated bone cells.," *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 83-A, no. 10, pp. 1514–23, 2001.
- [27] M. Hartig, U. Joos, and H. P. Wiesmann, "Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro," *Eur. Biophys. J.*, vol. 29, no. 7, pp. 499–506, 2000.
- [28] H.-P. Wiesmann, M. Hartig, U. Stratmann, U. Meyer, and U. Joos, "Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1538, no. 1, pp. 28–37, 2001.
- [29] R. Fitzsimmons, J. R. Farley, W. R. Adey, and D. Baylink, "Frequency Dependence of Increased Cell Proliferation , In Vitro , in Exposures to a Field : Evidence for Dependence on Increased Mitogen Activity Released Into Culture Medium," *J. Cell. Physiol.*, vol. 139, pp. 586–591, 1989.
- [30] I. Binderman, Somjen, Shimshoni, Levy, Fischler, and Korenstein, "stimulation of skeletal derived cell cultures by different electric field intensities is cell specific," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.*, vol. 237, pp. 225–229, 1985.

- [31] H. T. Unit, "Biochemical determinations The capacitive-pulsed electric stimulation," vol. 3, pp. 302–307, 1984.
- [32] M. Griffin, A. Sebastian, J. Colthurst, and A. Bayat, "Enhancement of Differentiation and Mineralisation of Osteoblast-like Cells by Degenerate Electrical Waveform in an In Vitro Electrical Stimulation Model Compared to Capacitive Coupling," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e72978, 2013.
- [33] C. M. Creecy, C. F. O'Neill, B. P. Arulanandam, V. L. Sylvia, C. S. Navara, and R. Bizios, "Mesenchymal Stem Cell Osteodifferentiation in Response to Alternating Electric Current," *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 3–4, pp. 467–474, 2013.
- [34] R. Bizios, K. R. Ullmann, P. R. Supronowicz, P. M. Ajayan, D. W. Metzger, and B. P. Arulanandam, "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 499–506, 2002.
- [35] Y. Min *et al.*, "Self-doped polyaniline-based interdigitated electrodes for electrical stimulation of osteoblast cell lines," *Synth. Met.*, vol. 198, pp. 308–313, 2014.
- [36] S. Meng, Z. Zhang, and M. Rouabhia, "Accelerated osteoblast mineralization on a conductive substrate by multiple electrical stimulation," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 29, no. 5, pp. 535–544, 2011.
- [37] S. Meng, M. Rouabhia, and Z. Zhang, "Electrical stimulation modulates osteoblast proliferation and bone protein production through heparin-bioactivated conductive scaffolds," *Bioelectromagnetics*, vol. 34, no. 3, pp. 189–199, 2013.
- [38] G. Jin and G. Kim, "The effect of sinusoidal AC electric stimulation of 3D PCL/CNT and PCL/ β -TCP based bio-composites on cellular activities for bone tissue regeneration," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 10, p. 1439, 2013.
- [39] A. S. Çakmak *et al.*, "Synergistic effect of exogeneous and endogeneous electrostimulation on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on silk scaffolds," *J. Orthop. Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 581–590, 2016.
- [40] C. T. Brighton and S. R. Pollack, "Treatment of nonunion of the tibia with a capacitively coupled electrical field," *J Trauma*, vol. 24, pp. 153–155, 1984.
- [41] A. Impagliazzo, A. Mattei, G. F. Spurio Pompili, S. Setti, and R. Cadossi, "Treatment of nonunited fractures with capacitively coupled electric field," *J. Orthop. Traumatol.*, vol. 7, no. 1, pp. 16–22, 2006.
- [42] E. A. Makela, "Capacitively coupled electrical field in the treatment of a leg fracture after total knee replacement.," *J. Orthop. Trauma*, vol. 6, no. 2, pp. 237–240, 1992.
- [43] J. R. Pepper, M. A. Herbert, J. R. Anderson, and W. P. Bobechko, "Effect of capacitive coupled electrical stimulation on regenerate bone," *J. Orthop. Res.*, vol. 14, no. 2, pp. 296–302, 1996.
- [44] J. Behari, "Changes in bone histology due to capacitive electric field stimulation of ovariectomized rat," no. December, pp. 720–725, 2009.
- [45] C. T. Brighton, G. B. Pfeffer, and S. R. Pollack, "In vivo growth plate stimulation in various capacitively coupled electrical fields," *J. Orthop. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 42–49, 1983.

- [46] J. Manjhi, R. Mathur, and J. Behari, "Effect of low level capacitive-coupled pulsed electric field stimulation on mineral profile of weight-bearing bones in ovariectomized rats," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 92, no. 1, pp. 189–195, 2010.
- [47] S. Gabriel, R. W. Lau, and C. Gabriel, "The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, pp. 2271–2293, 1996.
- [48] S. Lavenus, P. Pilet, J. Guicheux, P. Weiss, G. Louarn, and P. Layrolle, "Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1525–1534, 2011.
- [49] "SolidWorks." [Online]. Available: <https://www.3ds.com/products-services/solidworks/>. [Accessed: 10-Oct-2017].
- [50] "Comsol." [Online]. Available: <https://www.comsol.com/comsol-multiphysics>. [Accessed: 10-Oct-2017].
- [51] "Conversão A/mm para T." [Online]. Available: http://www.hkd.co.jp/english/unit_conv/. [Accessed: 20-Oct-2017].
- [52] J. Zhou *et al.*, "Effects of 50Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentiation and mineralization potentials of rat osteoblasts," *Bone*, vol. 49, no. 4, pp. 753–761, 2011.
- [53] K. Heermeier *et al.*, "Effects of extremely low frequency electromagnetic field (EMF) on collagen type I mRNA expression and extracellular matrix synthesis of human osteoblastic cells," *Bioelectromagnetics*, vol. 19, no. 4, pp. 222–231, 1998.
- [54] Y. Yamamoto, Y. Ohsaki, T. Goto, A. Nakasima, and T. Iijima, "Effects of Static Magnetic Fields on Bone Formation in Rat Osteoblast Cultures," *J. Dent. Res.*, vol. 82, no. 12, pp. 962–966, 2003.
- [55] J. T. Ryaby *et al.*, "The role of insulin-like growth factor II in magnetic field regulation of bone formation," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 35, pp. 87–91, 1994.
- [56] B. R. Patla, "Small Angle Approximation for Non-parallel Plate Capacitors with Applications in Experimental Gravitation," p. 14, 2012.
- [57] C. T. Brighton, W. Wang, R. Seldes, G. Zhang, and S. R. Pollack, "Signal transduction in electrically stimulated bone cells," *J Bone Jt. Surg Am*, vol. 83–A, pp. 1514–1523, 2001.
- [58] M. Griffin, S. A. Iqbal, A. Sebastian, J. Colthurst, and A. Bayat, "Degenerate wave and capacitive coupling increase human MSC invasion and proliferation while reducing cytotoxicity in an in vitro wound healing model," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, 2011.
- [59] M. Hronik-Tupaj, W. L. Rice, M. Cronin-Golomb, D. L. Kaplan, and I. Georgakoudi, "Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields," *Biomed. Eng. Online*, vol. 10, no. 1, p. 9, 2011.
- [60] L. Li, "Electrical stimuli improve osteogenic differentiation mediated by aniline pentamer and PLGA nanocomposites," *Biomed. Reports*, pp. 428–432, 2013.
- [61] Scott and King, "A Prospective , Coupling Double-Blind of Electrical Capacitive Bones ' in the Treatment of Non-Union of Long," *J. Bone Jt. Surg.*, 1994.

- [62] E. J. Vresilovic, S. R. Pollack, and C. T. Brighton, "Treatment Capacitively of Recalcitrant Coupled Non-Union Electrical with," vol. 67, no. 4, pp. 577–585, 1985.
- [63] E. A. Makela, "Capacitively coupled electrical field in the treatment of a leg fracture after total knee replacement.," *J. Orthop. Trauma*, vol. 6, no. 2, pp. 237–240, 1992.

ANEXOS

A. Parâmetros mais importantes da estimulação e condições do meio a estimular sintetizadas em tabelas

Tabela 2 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares com eletrodos em paralelo (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteoponina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm ²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização	
Linha celular	MC3T3-E1)	Pré-confluente	Quadrada (duty cycle: 2.9%)	10	ND	14,5	ND	20h	68h [24h sem EE + 20h EE + 24h sem EE]	≈ IA	-	-	[23]
						20,3				≈ IA	-	-	
						31,9				↑ IA (+100%)	-	-	
						31,9				↑ IA (+35-100%)	-	-	
	MC3T3-E1	2 dias pós-confluência	Sinusoidal	60x10 ³	ND	0,02	300	24h	24h	↑ IA (+18.7%)	-	-	[25]
	TE-85	Pré-confluente	Sinusoidal	10	ND	1x10 ⁻⁷	ND	30 min	66.5h [48h sem EE (24h Serum + 24h Serum-free) + 30 min EE + 18h]	≈ IA	-	-	[24]
				12						≈ IA	-	-	
				14						↑ IA (+30%)	-	-	
				26						≈ IA	-	-	
	MC3T3-E1	2 dias pós-confluência	Sinusoidal	60	ND	0,02	300	30 min	24h [EE 30min + 23,5h sem EE]	↑ ADN (+17%)	-	-	[26]
								2h	24h [EE 2h + 22h sem EE]	↑ ADN (+23%)	-	-	
								6h	24h [EE 6h + 18h sem EE]	↑ ADN (+25%)	-	-	
								24h	24h	↑ ADN (+49%)	-	-	
	SaOS-2	Não confluenta	Degenerada	16	62,5x10 ³	0,1	ND	4h	28h [4h EE + 20h sem EE + 4h EE]	↑ MetB. A (2h) ↓ MetB.A (28h)	↑ ALPa(m) (28h), ALPa(i) (2h, 26h, 28h), ALPe; ↑ Col I; ↑ OPN; ↑ ON; ↑ BSP	↑ MM (+480%) (28h)	[32]

Tabela 3 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares com elétrodos em paralelo (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteoponina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE	Densidade da corrente [A/cm ²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização	
Linha celular	MC3T3-E1	2 dias Pós-confluência	Sinusoidal	60	ND	0,02	300	24h	24h	↑ ADN (+17% - 30min) (+23%-2h) (+25%-6h) (+49%-24h)	-	-	[57]

Tabela 4 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em células estaminais com elétrodos em paralelo (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteopontina; Col I – colágeno do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm ²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização	
Células estaminais	hBM-MSCs	ND	Degenerada	ND	62,5X10 ⁻³	ND	ND	3 h/dia	5 dias	↑ MetB	-	-	[58]
	hMSCs	(em hidrogel)	Sinusoidal	6,0x10 ³	ND	ND	ND	6 h/dia	14 dias	-	≈ Runx2; ≈ osterix; ≈ OPN (dias 7 e 14)	↑ OC (dia 14)	[33]
	hMSCs	Confluente	Sinusoidal	6,0x10 ³	ND	0.02	ND	40 min/dia	28 dias	-	↑ ALP (≈ dia 5) (-57.14% dia 10) (+86,43% dia 15) (+99.37% dia 20); ↑ Col 1 (-87.20% dia 5) (≈ dia 10) (+90.11% dia 15) (+90.77% dia 20)	-	[59]

Tabela 5 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em culturas primárias com elétrodos em paralelo (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteopontina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm²]	Tempo de	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização	
Culturas Primárias	Células de rato (sincipúcio)	Confluente	Quadrada (duty cycle 7,5x10 ⁻³ %)	3	ND	13	ND	5 min.	24h [5 min EE --> 24 h sem EE]	↑ IA (+40%)	-	-	[31]
						22				≈ IA	-	-	
						54				↑ IA (+240%)	-	-	
	Células de bovino	Sub-confluente	Quadrada	16	ND	60	ND	24h/dia	11 dias [4 dias sem EE + 7 dias EE]	↑ Nr. Cel. (+10-30%) (dia 7)	↑ ALP (+200 - 300%)	-	[27]
		Confluente							22 dias [4 dias sem EE + 18 dias EE]	-	↑ FN, ON, Col I, BSP, OPG (dias 9 a 22)	↑ OC (dias 13 e 18)	
	Células primárias de bovino	Pré-confluente (Confluente antes da aplicação do estímulo)	Quadrada	16	ND	60	ND	24h/dia	21 dias [7 dias sem EE + 14 dias EE]	-	-	↑[Ca2+]ecm; Corpos globolares mineralizados	[28]
						210				-	-	Cristais em forma de tiras	
	Osteoblastos de rato	(em polímeros condutores)	Sinusoidal	100	ND	ND	ND	1h/dia	8 dias [1 dia sem EE + 7 dias EE]	↑ MetB	↑ BMP-2, p-Smad4, Col I, ON	-	[60]
	Osteoblastos de rato (sincipúcio)	Confluente	ND	10	ND	ND	ND	6h/dia	21 dias	-	Nr. Cel. (+46%) (48h)	↑ Ca2+ (+307% dia 21)	[34]

Tabela 6 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em culturas primárias com elétrodos em paralelo (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteoponina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos		
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização
Culturas Primárias	Células de ave (sincipúcio)	ND	ND	8	ND	1x10 ⁻⁷	ND	30 min.	18,5h [30 min EE + 18 h sem EE]	≈ IA	-	-
				12						≈ IA	-	-
				16						↑ IA (+30%)	-	-
				20						≈ IA	-	-
				24						≈ IA	-	-
										[29]		

Tabela 7 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em linhas celulares e células estaminais para configurações de elétrodos não paralelas (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteoponina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoproteína óssea; ON – osteonectina.).

Cultura celular			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm ²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização	
Linhas celulares	MC3T3-E1	confluente	Sinusoidal	1x10 ³	ND	ND	ND	24h/dia	12 dias	-	↑ ALP (+1,70% dia 3) (+25% dia 6) (+43,59% dia 9) (+30,23% dia 12)	-	[35]
	MC3T3-E1	Pré-confluente	Sinusoidal	14	ND	ND	ND	4.5h/dia	21 dias	Nr. Cel. (≈ 50%)	ALP (-9,52%) ↑ Col1 (+1,75% dia 7) (+56,67% dia 14)	-	[3]
				60x10 ⁻³				30min/dia		Nr. Cel. (≈ 50%)	ALP (-9,52%) ↑ Col1 (+100% dia 7) (+80% dia 14)	-	
Células estaminais	BMSCs (rato)	confluente	Sinusoidal	1x10 ³	ND	ND	ND	24h/dia	12 dias	-	↑ ALP (+11,30% dia 3) (+10,45% dia 6) (+6,38% dia 9) (-13,63% dia 12)	-	[35]

Tabela 8 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em scaffolds (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteopontina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialoptoteína óssea; ON – osteonectina.).

Scaffold			Características do estímulo							Resultados osteogénicos			Referências	
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE	Densidade da corrente [A/cm ²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	Mineralização		
Scaffolds	Saos-2 num substrato à base de de polilactida biodegradável (95 wt%) e polipirrol bio ativado com heparina (PPy/HE) (5 wt%)	ND	ND	ND	ND	0,2	ND	Três períodos de 6h	6 dias	-	↑ ALP (+57,5%) ↑ BMP2 (+60%) ↑ RUNX-2 (+37,04%)	↑ OC (+53,33%)	[36]	
	Saos-2 num substrato à base de de polilactida biodegradável (95 wt%) e polipirrol bio ativado com heparina (PPy/HE) (5 wt%)	ND	ND	ND	ND	0,2	ND	2h	2h	120% (48h depois de EE)	ND	↑ OC (+60%)	[37]	
								4h	4h			↑ OC (+52,17%)		
								6h	6h			↑ OC (+1%)		
								8h	8h			↑ OC (+29%)		
						0,4		2h	2h	80%	ND	↑ OC (+11,11%)		
								4h	4h	-		↑ OC (+8,82%)		
								6h	6h	60%		≈ OC		
								8h	8h	-		↑ OC (-8,57%)		
	hMSCs cultivadas em scaffolds de seda	ND	ND	60x10 ³	ND	ND	ND	1h/dia	28 dias	↑ DNA (-27,27% dia 7 +21,62% dia 14 -45,96% dia 28) Col I (≈ dia 14 +61,11 dia 28)	ALP (+62,5% dia 7 -11,48% dia 14 +40% dia 28) Col I (≈ dia 14 +61,11 dia 28)	↑ Ca2+ (+100% dia 7 -9,52% dia 14 +70% dia 28)	[39]	

Tabela 9 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em scaffolds (ND – características do estímulo não definidas; NA – não aplicado; EE – estimulação elétrica; IA – quantificação de ADN exógeno; MetB – ensaios de viabilidade metabólica celular; ADN – conteúdo de ADN; ALPa – atividade de fosfatase alcalina (i – intracelular; m – meio); ALPe – expressão de fosfatase alcalina; MM – mineralização da matriz; OPN – osteoponina; Col I – colagénio do tipo I; BSP – sialopteína óssea; ON – osteonectina.).

Scaffold			Características do estímulo						Resultados osteogênicos			Referências
Tipo	Descrição	Estado de confluência	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Periodicidade [s]	Intensidade CE [V/cm]	Densidade da corrente [A/cm²]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Proliferação	Diferenciação	
Scaffolds	MG63	pure PCL	ND	60	ND	55x10 ⁻³	ND	30 min./dia (apenas 3 dias depois)	17 dias	Nr. Cel. (-3,55% dia 7 -1% dia 10 -11,25 dia 17)	↑ ALP (+25% dia 10 +30% dia 17)	↑ Ca2+ (+35% dia 10 +20% dia 17)
		PCL/CNT-0.2 wt%								Nr. Cel. (-3,55% dia 7 ≈ dia 10 -13,75% dia 17)	↑ ALP (+22% dia 10 +32% dia 17)	↑ Ca2+ (+25% dia 10 +20% dia 17)
		PCL/b-TCP-20 wt%								Nr. Cel. (-8,05% dia 7 -15,84% dia 10 -14,29% dia 17)	↑ ALP (+22,5% dia 10 +65% dia 17)	↑ Ca2+ (+17,5% dia 10 +50% dia 17)

Tabela 10 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em pacientes humanos.

Descrição do estudo			Características do estímulo exterior						Resultados osteogénicos		Referências
Descrição dos elétrodos	Patologia e localização	Tamanho da amostra	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Intensidade CE [V/cm]	Amplitude (pico-a-pico) [V]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Resultados osteogénicos	Conclusões	
2 elétrodos redondos colocados em paralelo sob a zona do osso fraturado	Não união de pelo menos 9 meses sem intervalo de fratura (Tíbia, ulna e fémur)	10 ativos 11 controlo	sinusoidal	60x10 ³	ND	5-10	ND	Até ficar curada (6 meses max.)	Sucesso: +60%	AC eficiente no tratamento da união óssea	[61]
2 elétrodos de aço inoxidável colocados sob a pele na zona da fratura	Não união sem sinais de melhoria	10x tíbia	sinusoidal	60x10 ³	ND	5	ND	12 semanas. Se a fratura não estiver curada ao fim desse tempo prolongou-se para até ficar (média de 24,8 semanas)	80%	União óssea sólida alcançada. Taxa total de sucesso: 77,3% (média de 22,5 semanas)	[62]
		3x rádio							100%		
		2x fémur							50%		
		1x colo do fémur							100%		
		1x úmero							100%		
		1x côndilo femoral medial							100%		
		1x clavícula							100%		
		1x escafoide							100%		
		2x ulna							0%		
2 elétrodos de aço inoxidável, com 3 cm de diâmetro, colocados sob a pele por cortes no gesso que envolve a zona afetada	Não união com mais de 9 meses sem sinais de melhoria nos últimos 3 meses	56 (52% fraturas localizadas a 1/3 da tíbia)	sinusoidal	60x10 ³	ND	5	24h/dia	12-24 semanas	Sucesso: 96%	Como mais fatores de risco estavam presentes, as taxas de cura previstas diminuíram	[42]

Tabela 11 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em pacientes humanos.

Descrição do estudo			Características do estímulo exterior					Resultados osteogénicos	Conclusões	Referências	
Descrição dos eletrodos	Patologia e localização	Tamanho da amostra	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Intensidade CE [V/cm]	Amplitude (pico-a-pico) [V]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Resultados osteogénicos		Conclusões
2 eletrodos de hidrogel colocados paralelamente sob o membro fraturado. Dimensão do eletrodo adesivo: 10x5 cm.	Estimular a osteogénese em pacientes que sofriam de fraturas não unidas. Nenhuma evidência radiológica de formação de calo. Fraturas infectadas incluídas.	10x tíbias	sinusoidal	60x10 ³	ND	ND	8h/dia	Média de 10 semanas	80%	Taxa total de sucesso: 83.33% Todos os casos que falharam tratavam-se de não uniões instáveis. AC é um tratamento eficiente e bem aceite pelos pacientes. 8 h de uso diárias provaram-se efetivas	
		9x fémur							100%		
		5x antebraços							80%		
		2x Úmeros							0		
		4x outros							100%		
Eléttrodos circulares com 3 cm de diâmetro, colocados paralelamente sob membro fraturado	Tratamento CC numa não união persistente da tíbia	1	Sinusoidal	60x10 ³	ND	5	ND	6 meses	Curada em 6 meses	AC eficiente	[40]
Eléttrodos circulares de aço inoxidável colocados paralelamente sob uma tíbia	Não união relacionado à prótese do joelho. Fratura da tíbia após de uma artroplastia do joelho	1	ND	ND	ND	ND	ND	12 semanas	Consolidação da fratura com abundante formação de calo (12 semanas - 1 ano e 3 meses após lesão)	AC eficaz no tratamento da fratura num paciente com uma prótese articular quando uma cirurgia não podia ser realizada	[63]

Tabela 12 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.

Propriedade do estudo				Características do estímulo exterior						Resultados osteogênicos		Referências
Descrição dos elétrodos	Cobaias	Estudo e localização	Tamanho da amostra	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Intensidade CE [V/cm]	Amplitude elétrodo (pico-a-pico) [V]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Resultados	Conclusões	
Par de elétrodos de dimensão 1.8x1.8 cm de aço inoxidável colocados paralelamente sob a tíbia direita. pele	Coelhos brancos da Nova-Zelândia com 7 semanas de idade	O crescimento da tíbia no coelho pode ser estimulado de forma a crescer mais rápido de uma maneira consistente com voltagens e correntes seguras para o uso em humanos	20 (50% placebo)	Sinusoidal	60x10 ³	1.65	2.5	24 h/dias	96h (ES só nas primeiras 48h)	+4,3%	Voltagem ótima (pico-a-pico) foi de 5-10V. Menor que 5V não é eficiente. Acima de 10V chegou mesmo a atrasar o crescimento	[45]
			20 (50% placebo)			3.3	5			+9,2%		
			20 (50% placebo)			6.6	10			+7,8%		
			20 (50% placebo)			13.2	20			-3,6%		
Elétrodos compostos por folhas de metal flexíveis estendidas sob grande parte do fêmur e tíbia.	Fêmeas adultas de Wistar rats	Eficácia de estimulação CC para prevenir a perda óssea em ratos com osteoporose (Fémur/Tíbia)	20	Quadrada	16	ND	10	2h/dia	60 dias	BMC (+23,9% Fémur; +23,98 Tíbia) BMD (+33,51% Fémur; +37,53% Tíbia) Ca (+8,91%) P (+19,51%) C (+7,83%)	Os resultados mostraram que 60 sessões de estimulação AC 2 horas por dia atenuaram de forma eficaz a perda mineral no osso de ratos com osteoporose	[46]

Tabela 13 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.

Propriedade do estudo				Características do estímulo exterior						Resultados osteogênicos		Referências
Descrição dos elétrodos	Cobaias	Estudo e localização	Tamanho da amostra	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Intensidade CE [V/cm]	Voltagem (pico-a-pico) [V]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Resultados	Conclusões	
2 elétrodos com 35 cm de diâmetro, colocados na superfície central e lateral da perna direita no local da corticotomia	Beagles macho adultos	Determinar se CC aumenta a taxa de recuperação de força e regeneração óssea como resultado do alongamento pela técnica de Ilizarov	34 (50% Controlo)	ND	60x10 ³	ND	3-6.3	24h/dia	55 dias (ES aplicada ao 27th dia durante 28 dias)	Modulo da rigidez (-37% diminuição) Menor percentual de perímetro ostenido ativo (-20%)	Os dados experimentais sugerem que quando esta dose de estimulação elétrica AC é aplicada ao osso em regeneração durante a osteogênese, atrasa a recuperação da força óssea em comparação com um controle não tratado.	[43]

Tabela 14 - Características da estimulação capacitiva e resultados biológicos em estudos in vivo em cobaias animais.

Propriedade do estudo				Características do estímulo exterior					Resultados osteogénicos		Referências	
Descrição dos eletrodos	Cobaia	Estudo e localização	Tamanho da amostra	Tipo de onda	Frequência [Hz]	Intensidade CE [V/cm]	Voltagem (pico-a-pico) [V]	Tempo de exposição	Duração do estudo	Resultados		Conclusões
ND	Fêmeas adultas de Wistar rats.	O objetivo deste estudo foi estudar os efeitos de estimulação elétrica capacitiva num osso com osteoporose assim tentar criar uma possível terapia para essa condição (Fémur e tibia)	ND	ND	16	ND	10	2h/dia	60 dias	As células da medula óssea foram novamente proliferadas e colocadas homogeneamente na cavidade da medula do grupo exposto. Mais atividade de ALP confirmou a maior diferenciação osteoblástica. Mais conteúdo de colagénio	Os resultados sugerem que a estimulação capacitiva pode levar a uma melhoria significativa na qualidade dos ossos após dois meses de exposição. A exposição elétrica pode melhorar a osteogénese, aumentando a densidade das células ósseas, a diferenciação dos osteoblastos e a formação de colágeno, o que leva à restauração a níveis microestruturais.	[44]

B. Propriedades dos elementos e simulação para os diferentes tipos de malhas

Tabela 15 - Propriedades da malha "Coarse".

Coarse				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Coarse	Substrato	3	0,56	13 059
	Ar			
	Meio Fisiológico			
Coarse	Placa de Petri	3	0,56	6 243
	Eléttodos			
Coarse	Meio Celular	3	0,56	3 851
Total		23 153		
Tempo de simulação		2 min.		

Tabela 16 - Propriedades da malha "Normal".

Normal				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Normal	Substrato	2	0,36	32 630
	Ar			
	Meio Fisiológico			
Normal	Placa de Petri	2	0,36	14 060
	Eléttodos			
Normal	Meio Celular	2	0,36	9 206
Total		55 896		
Tempo de simulação		5 min.		

Tabela 17 - Propriedades da malha "Fine".

Fine				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Fine	Substrato	1,6	0,2	95 779
	Ar			
	Meio Fisiológico			
Fine	Placa de Petri	1,6	0,2	64 579
	Eléttodos			
Fine	Meio Celular	1,6	0,2	28 103
Total		188 461		
Tempo de simulação		16 min.		

Tabela 18 - Propriedades da malha "Costum_1".

Costum_1				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Coarser	Substrato	3,8	0,8	47 113
	Ar			
	Meio Fisiológico			
Coarse	Placa de Petri	3	0,56	37 442
	Eléttodos			
Fine	Meio Celular	1,6	0,2	28 053
Total		112 608		
Tempo de simulação		15 min.		

Tabela 19 - Propriedades da malha "Costum_2"

Costum_2				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Corse	Substrato	3	0,56	59 711
	Ar			
	Meio Fisiológico			
Normal	Placa de Petri	2	0,36	53 178
	Eléttodos			
Fine	Meio Celular	1,6	0,2	28 078
Total		140 967		
Tempo de simulação		14 min.		

Tabela 20 - Propriedades da malha "Costum_3".

Costum_3				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Coarse	Substrato	3	0,56	102 025
	Ar			
	Meio Fisiológico			
C_Normal	Placa de Petri	1,5	0,2	98 902
	Eléttodos			
C_Fine	Meio Celular	1,4	0,15	46 850
Total		247 777		
Tempo de simulação		21 min.		

Tabela 21 - Propriedades da malha "Costum_4".

Costum_4				
Malha	Componente	Tamanho max. [mm]	Tamanho min. [mm]	total
Normal	Substrato	2	0,36	250 628
	Ar			
	Meio Fisiológico			
C_Fine	Placa de Petri	1,4	0,15	226 537
	Elétrodos			
C_Fine	Meio Celular	1	0,1	103 856
Total		581 021		
Tempo de simulação		55 min.		

C. Correlação das dinâmicas estímulo exterior aplicado e os campos elétricos e magnéticos no meio celular

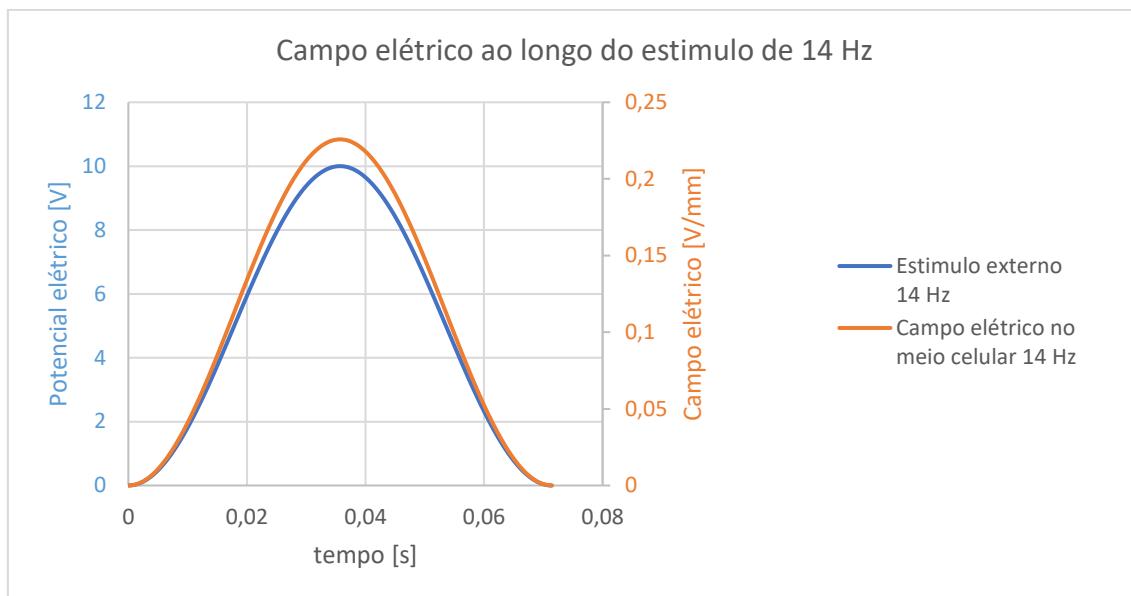


Figura 61 – Dinâmicas do estímulo exterior BF e CE no meio celular ($x=0,15\text{mm}$; $y=0\text{mm}$; $z=0,51\text{mm}$) para a configuração em co-superfície padrão listado.

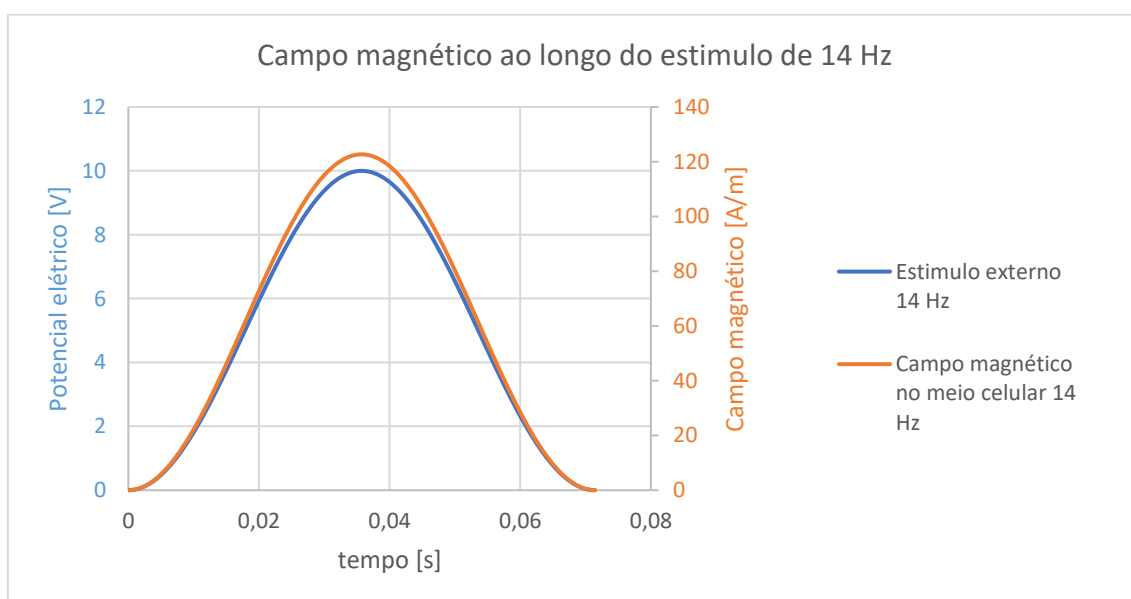


Figura 62 - Dinâmicas do estímulo exterior BF e CM no meio celular ($x=0,15\text{mm}$; $y=0\text{mm}$; $z=0,51\text{mm}$) para a configuração em co-superfície padrão listado.

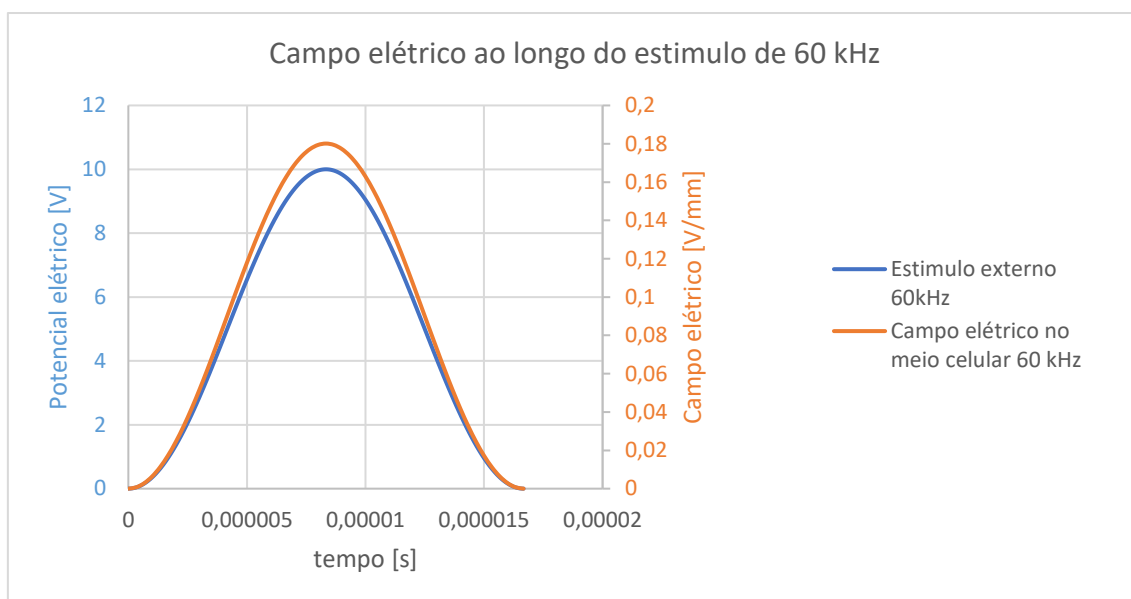


Figura 63 - Dinâmicas do estímulo exterior AF e CE no meio celular ($x=0,15\text{mm}$; $y=0\text{mm}$; $z=0,51\text{mm}$) para a configuração em co-superfície padrão listado.

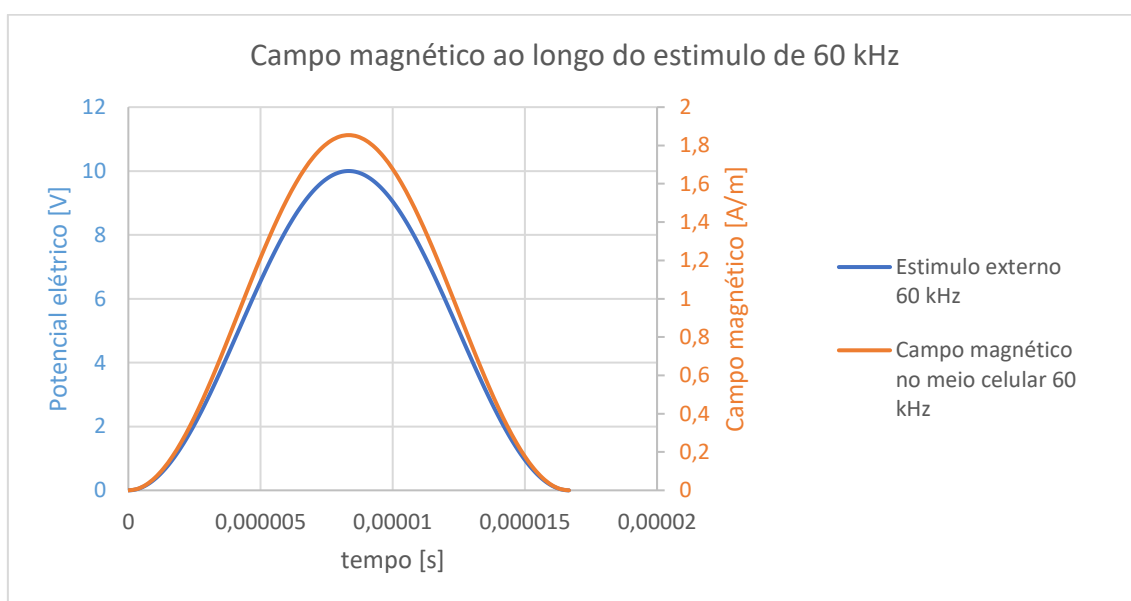


Figura 64 - Dinâmicas do estímulo exterior AF e CM no meio celular ($x=0,15\text{mm}$; $y=0\text{mm}$; $z=0,51\text{mm}$) para a configuração em co-superfície padrão listado.

- D. Campos elétricos e magnéticos no meio celular para as diferentes configurações e frequências quando se varia a amplitude do potencial aplicado

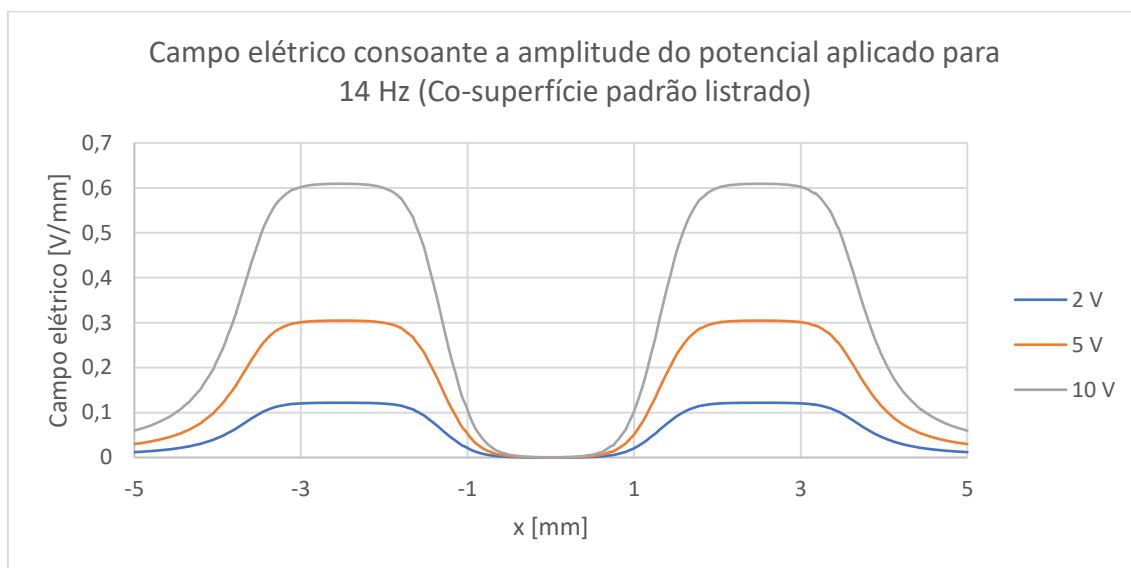


Figura 65 – CE consoante a amplitude do potencial aplicado para BF (Co-superfície padrão listrado).

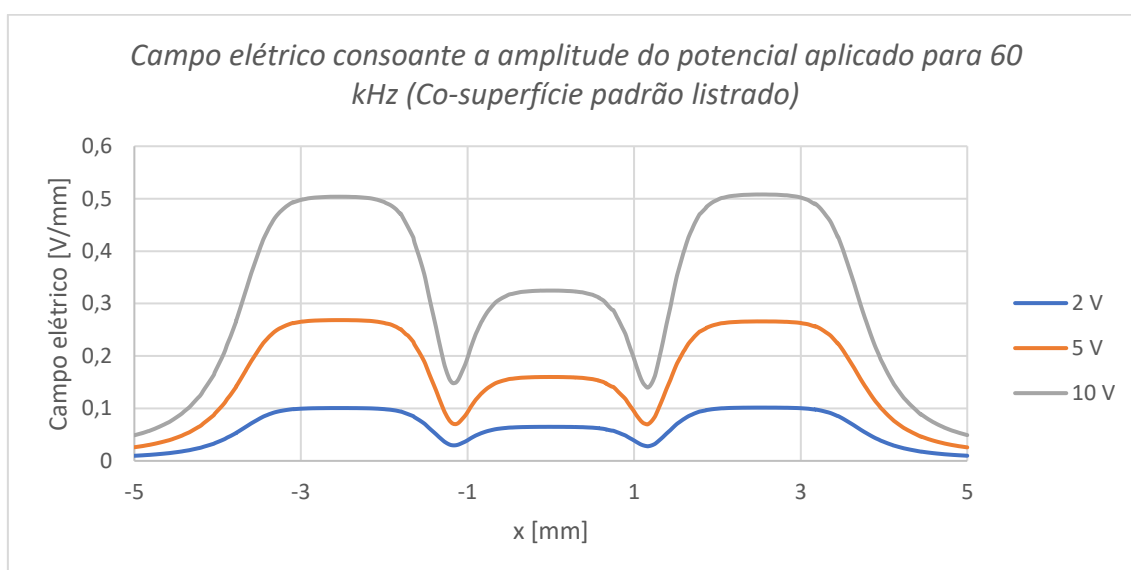


Figura 66 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado para AF (Co-superfície padrão listrado).

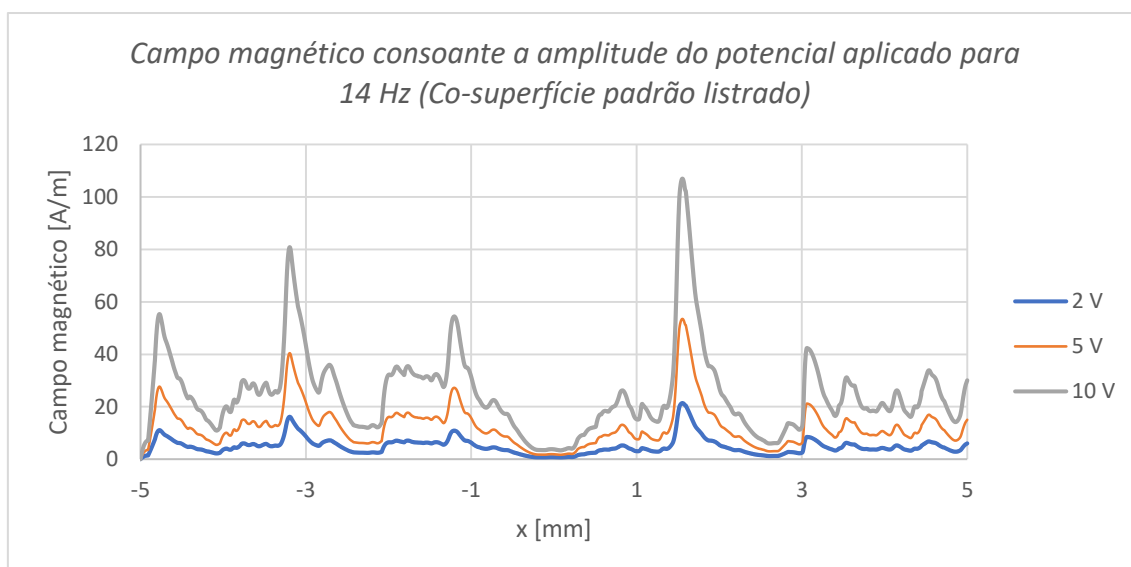


Figura 67 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado para BF (Co-superfície padrão listrado).

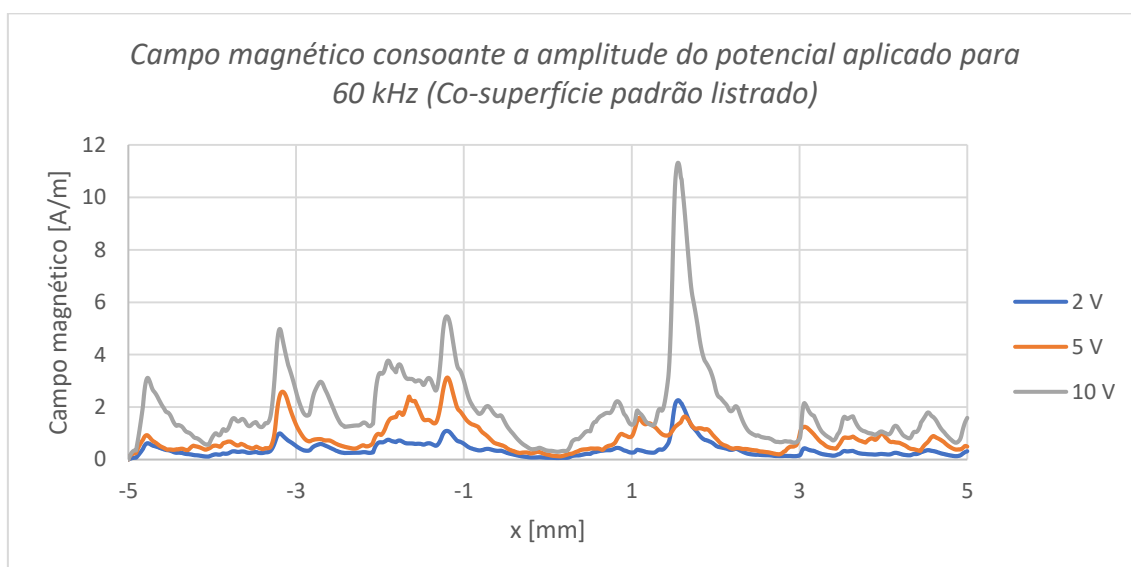


Figura 68 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado para AF (Co-superfície padrão listrado).

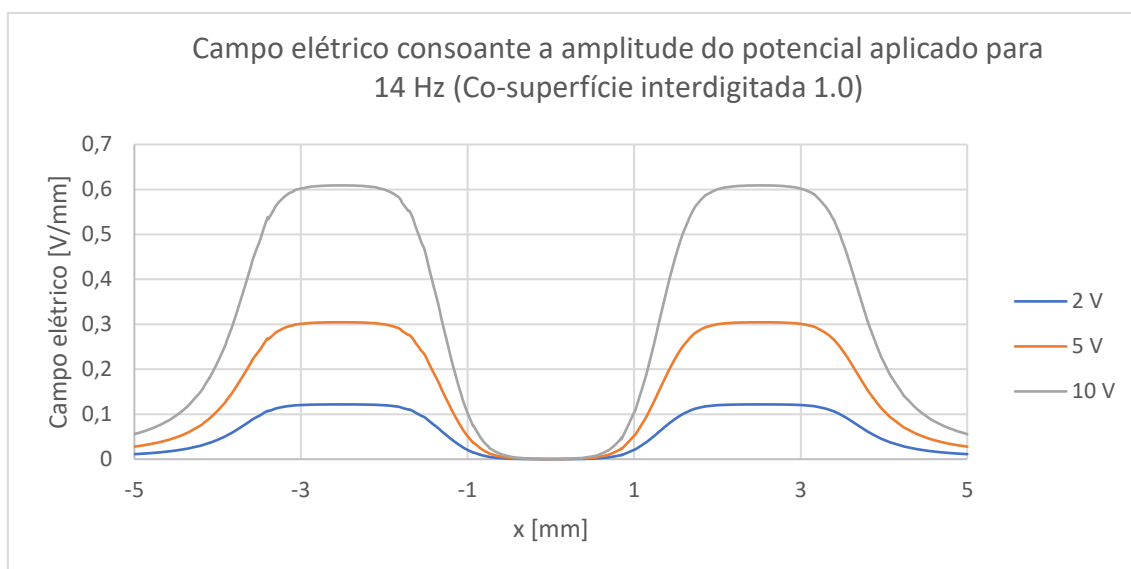


Figura 69 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 1.0).

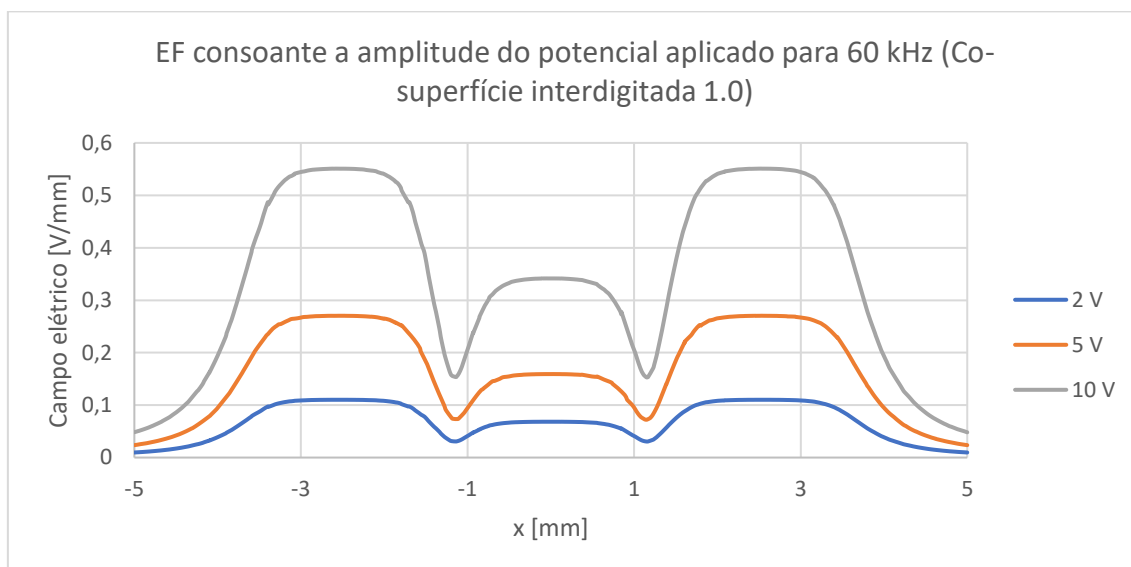


Figura 70 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 1.0).

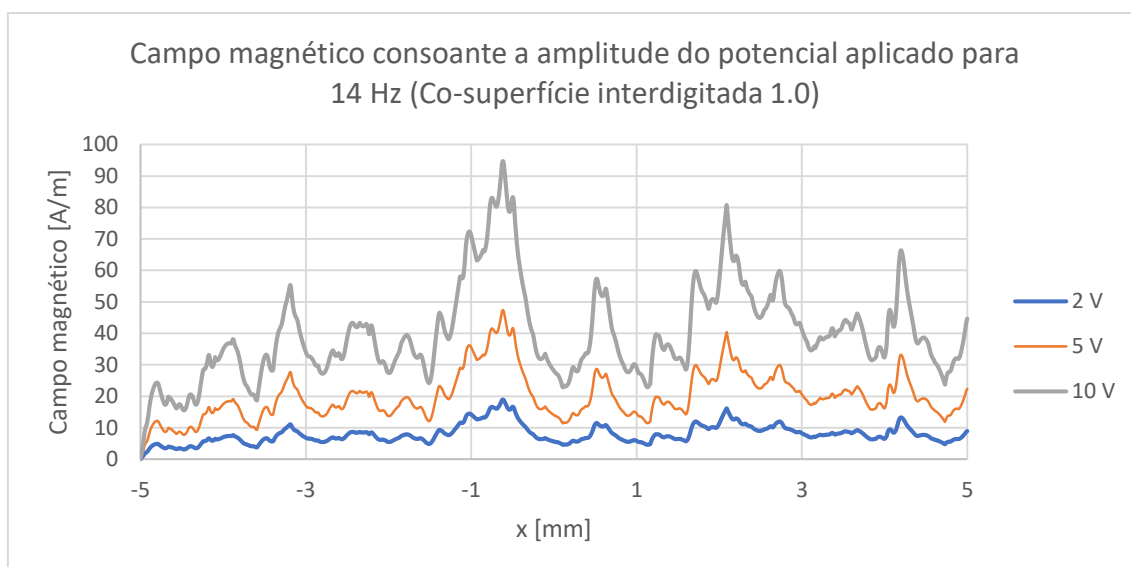


Figura 71 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 1.0).

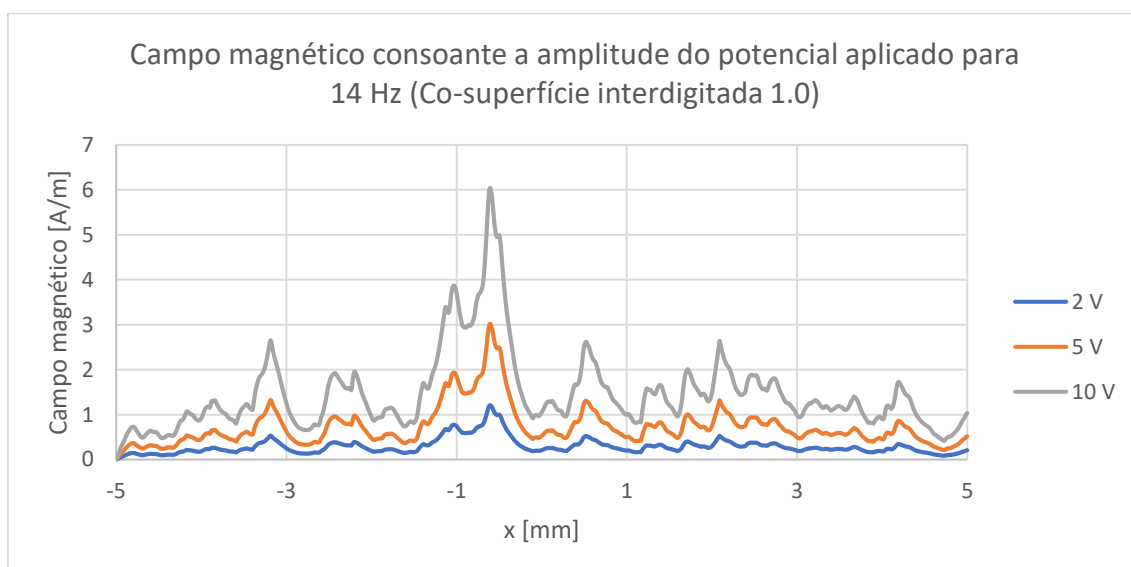


Figura 72 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 1.0).

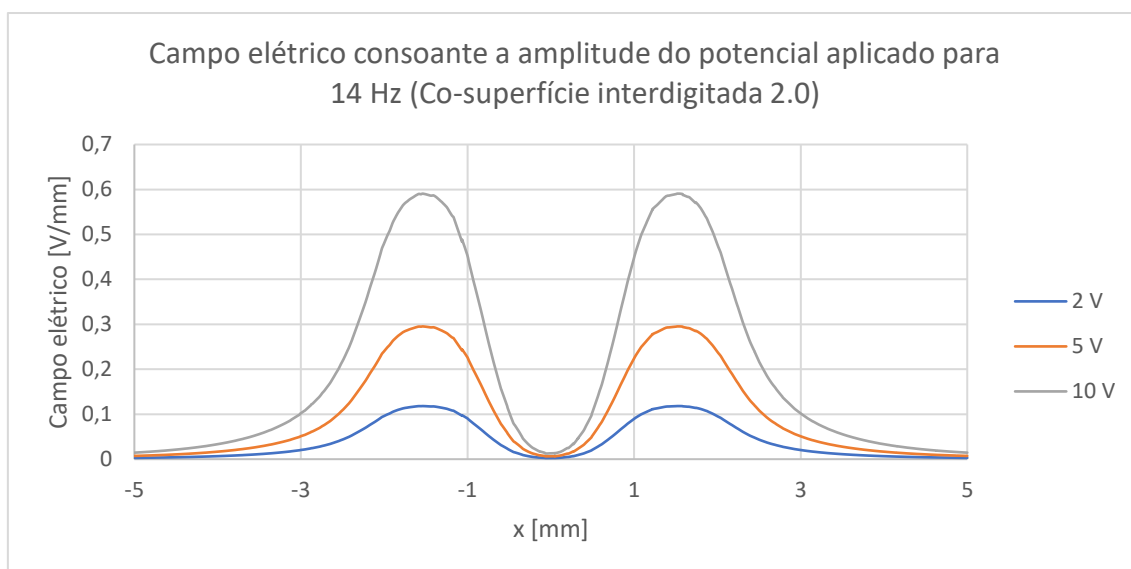


Figura 73 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 2.0).

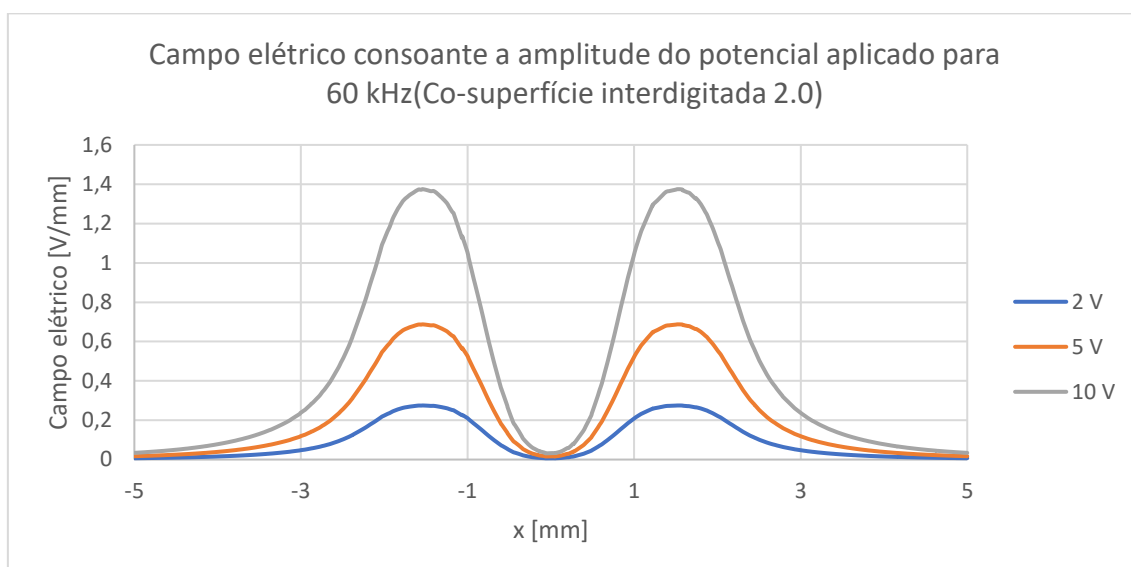


Figura 74 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 2.0).

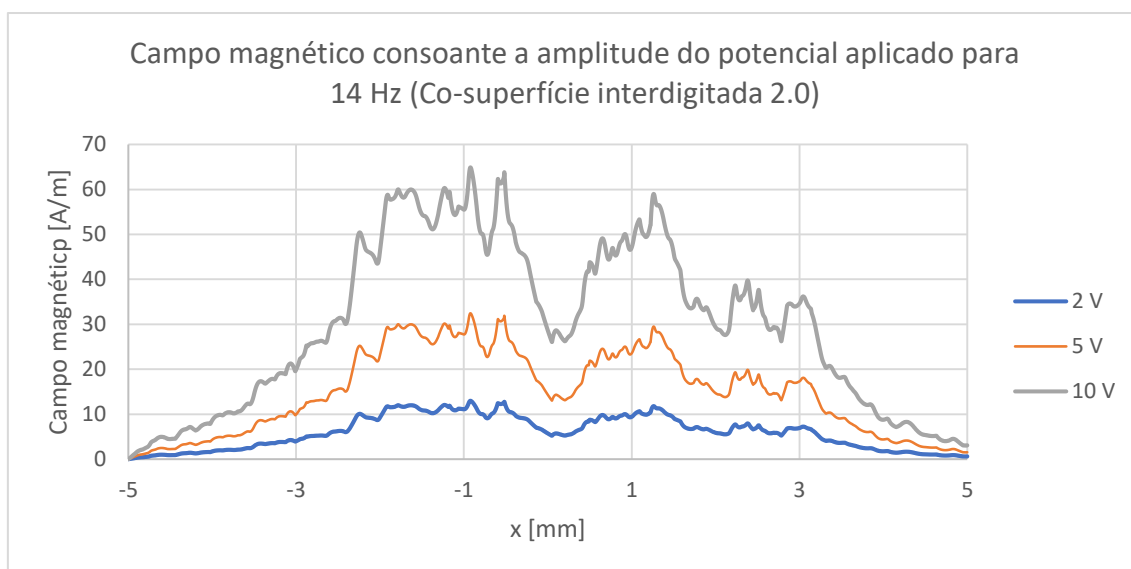


Figura 75 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície interdigitada 2.0).

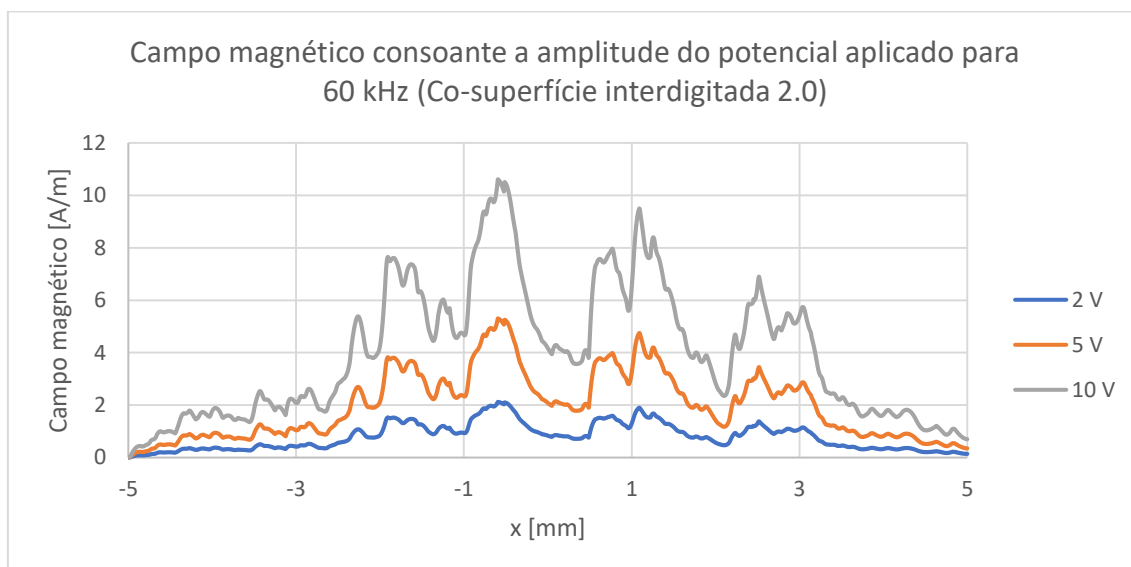


Figura 76 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície interdigitada 2.0).

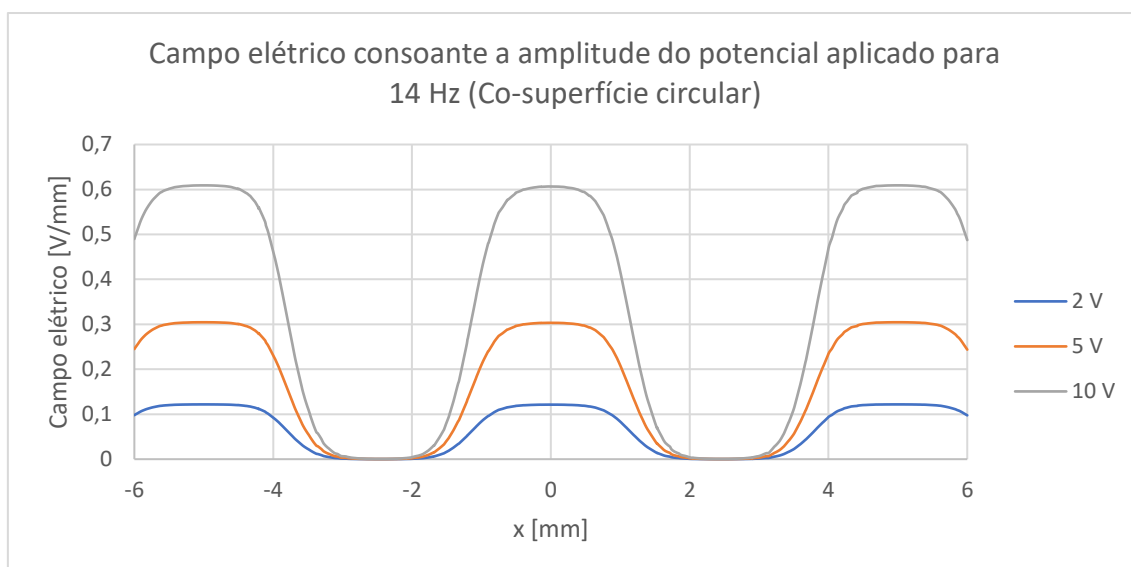


Figura 77 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície circular).

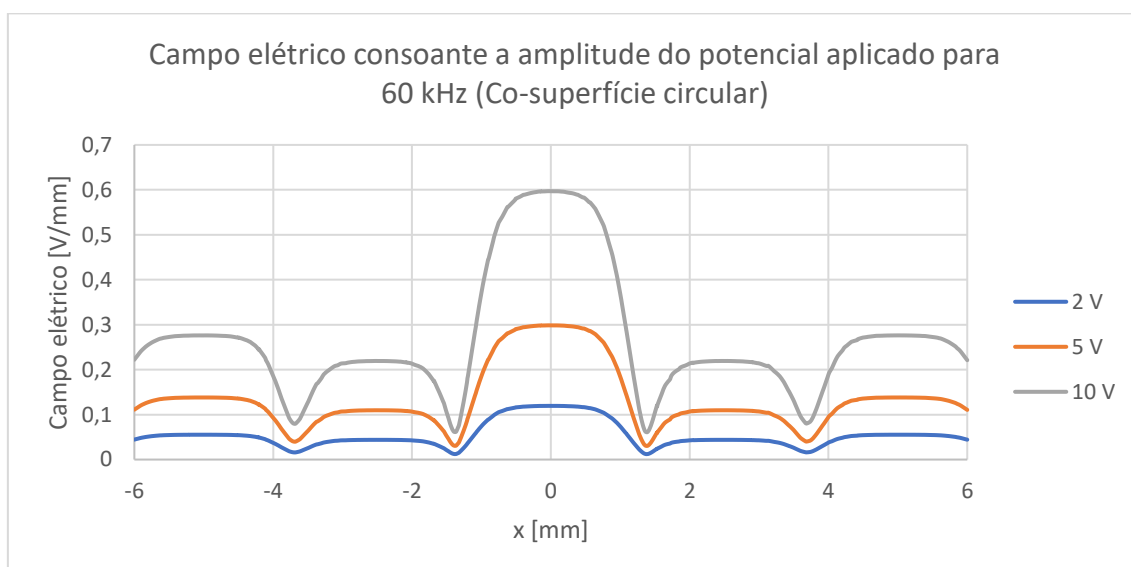


Figura 78 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície circular).

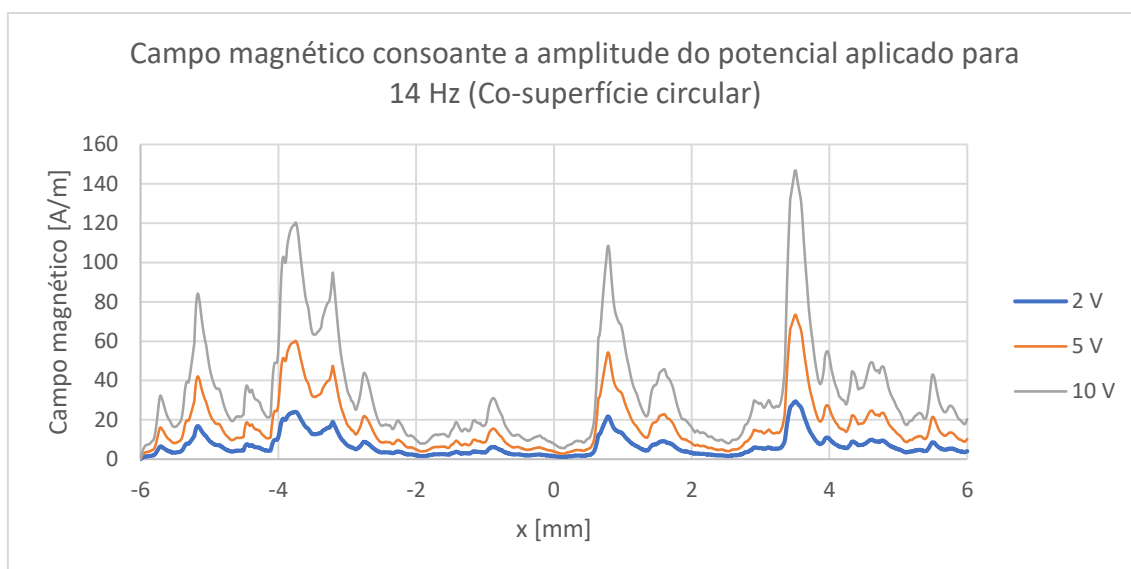


Figura 79 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Co-superfície circular).

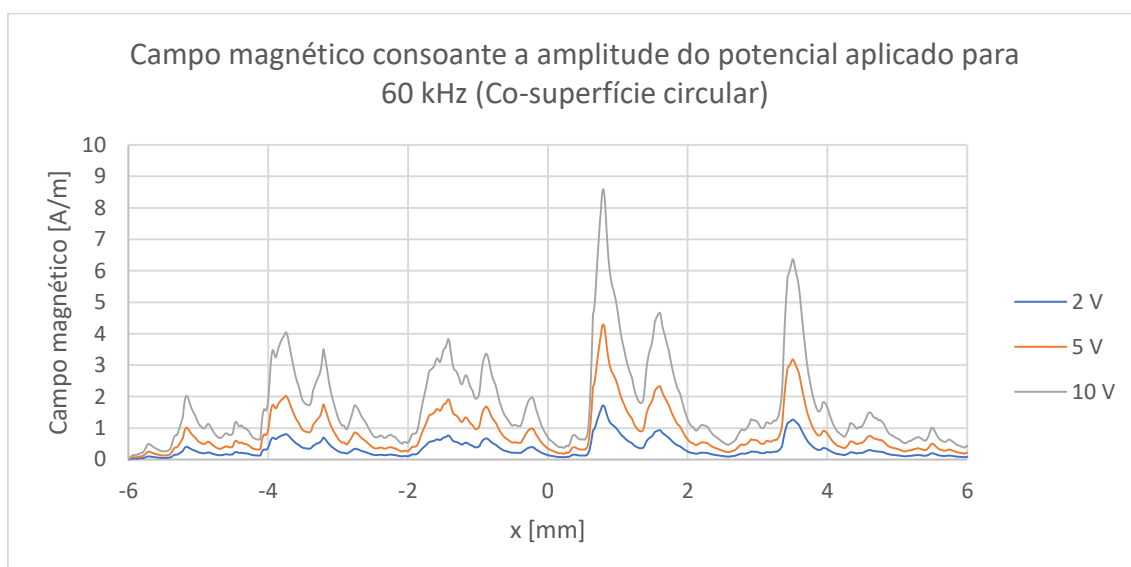


Figura 80 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Co-superfície circular).

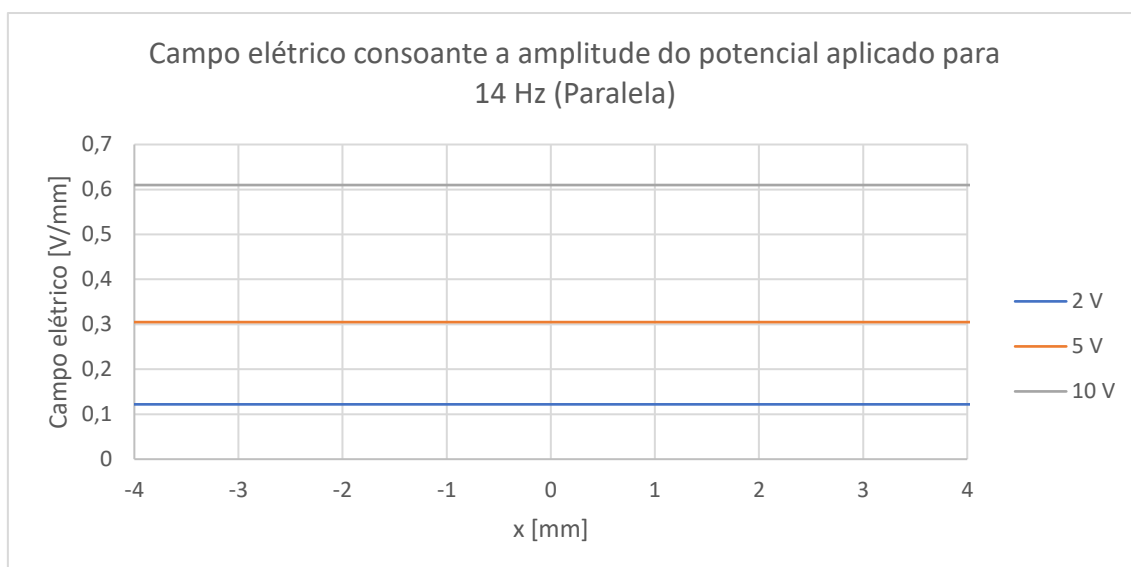


Figura 81 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Paralela).

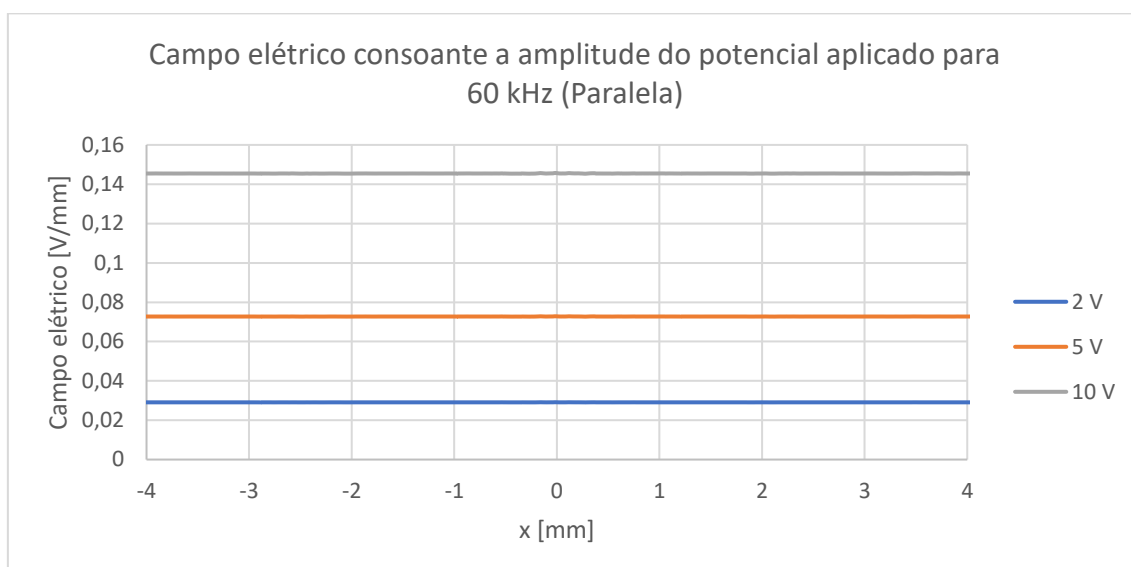


Figura 82 - CE consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Paralela).

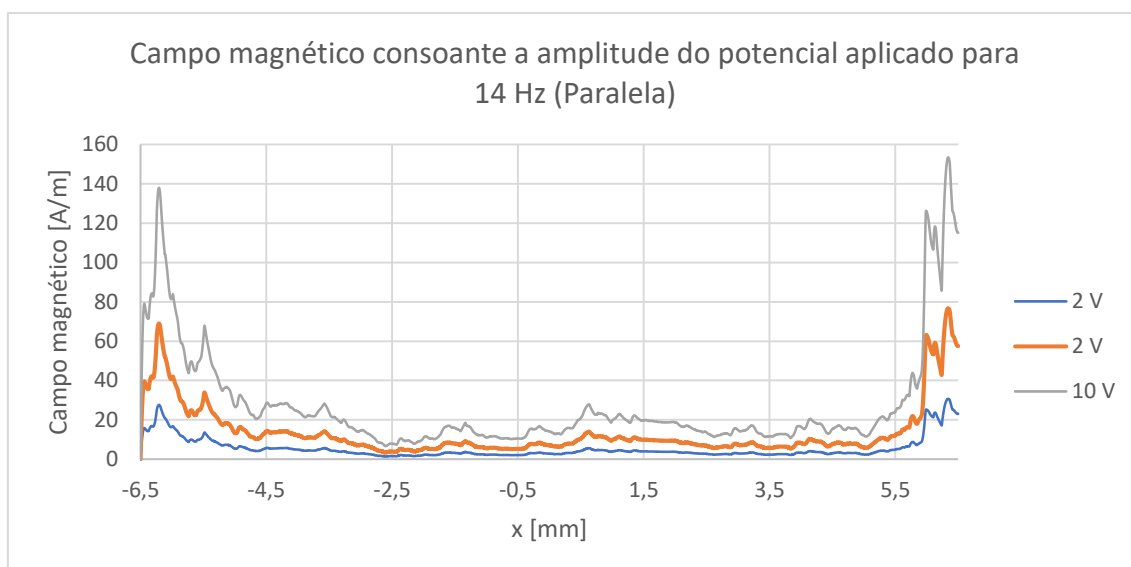


Figura 83 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em BF (Paralela).

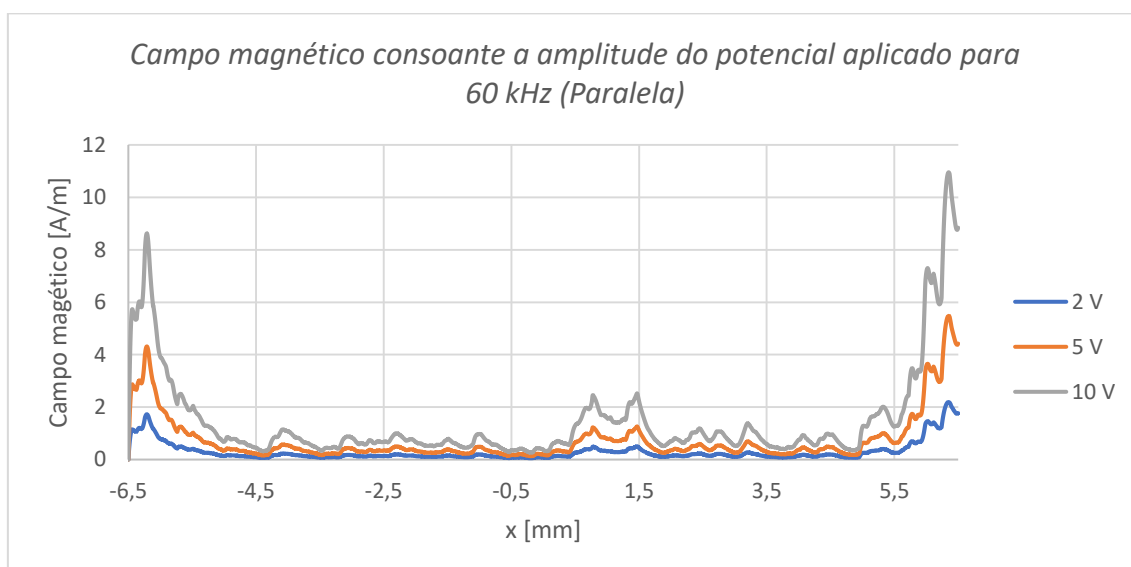


Figura 84 - CM consoante a amplitude do potencial aplicado em AF (Paralela).

E. Validação dos modelos simplificados

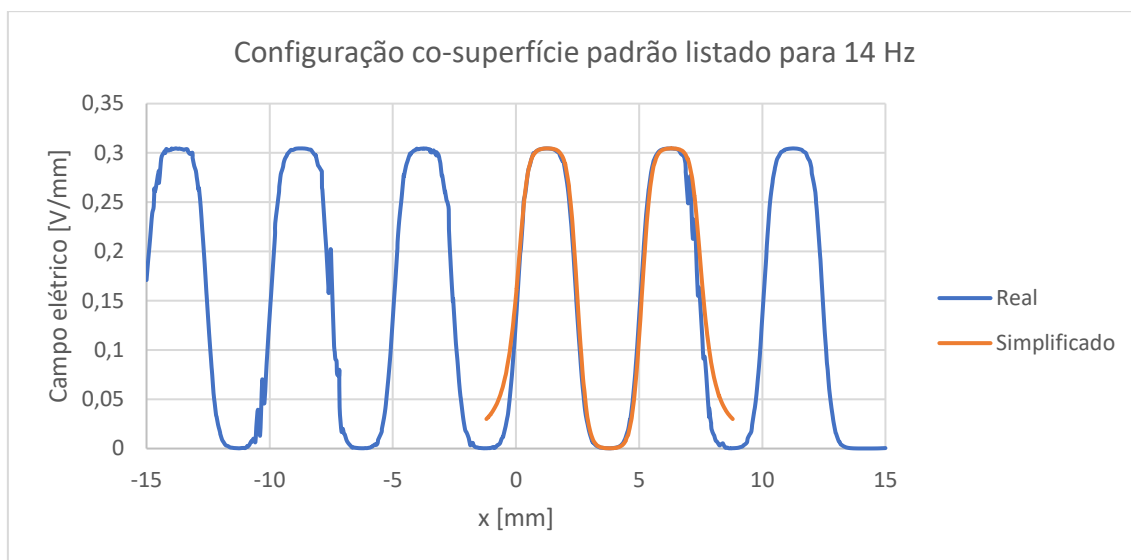


Figura 85 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície listrado.

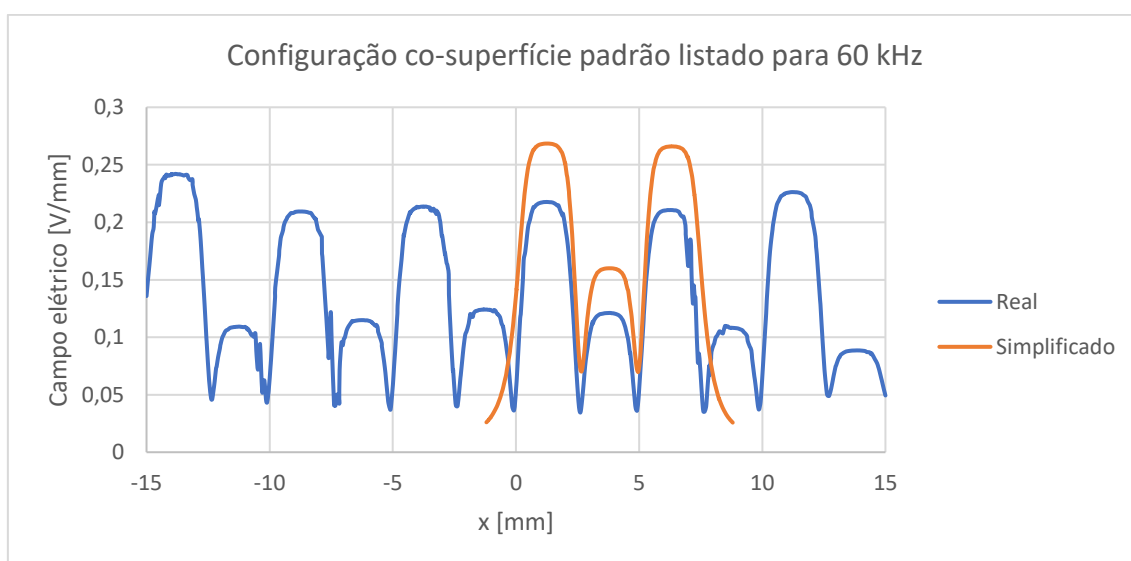


Figura 86 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície listrado.

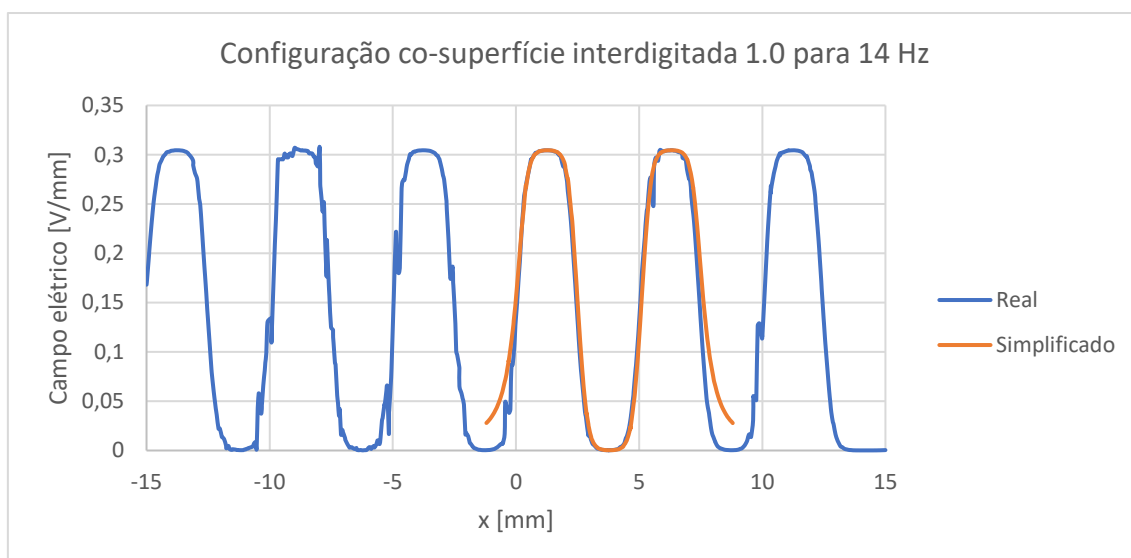


Figura 87 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.

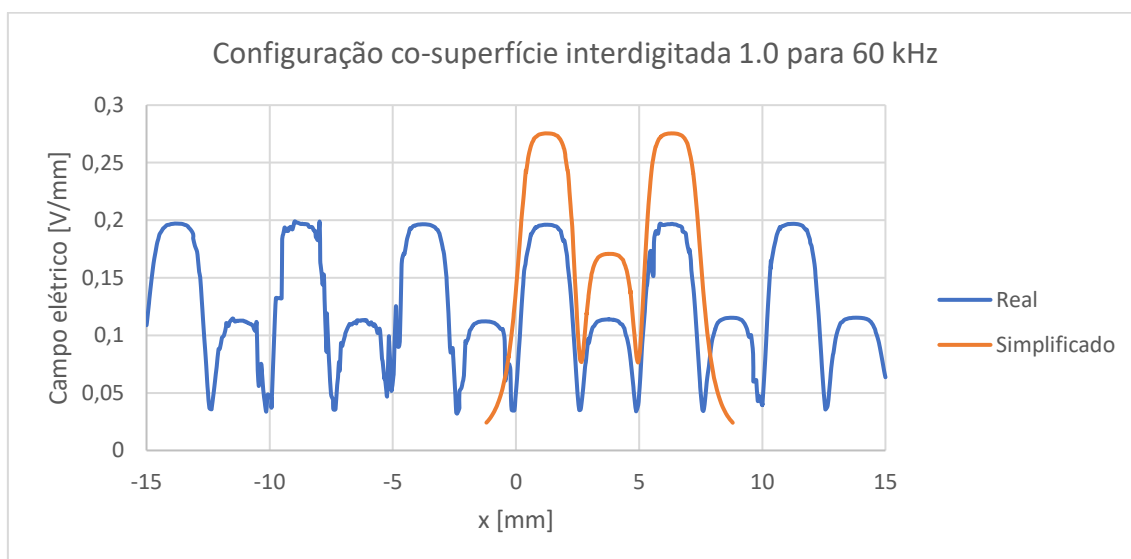


Figura 88 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 1.0.

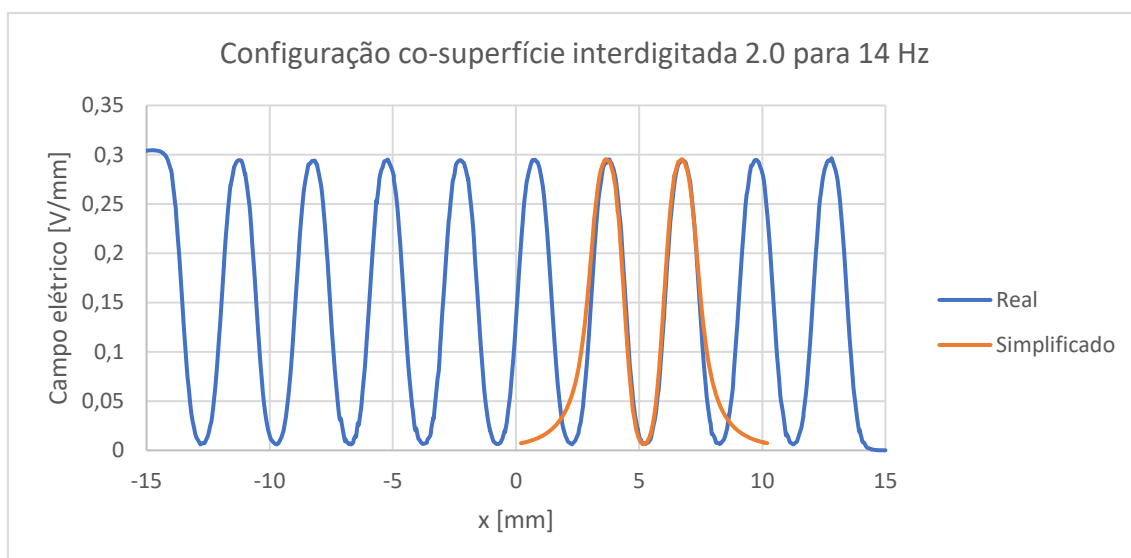


Figura 89 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.

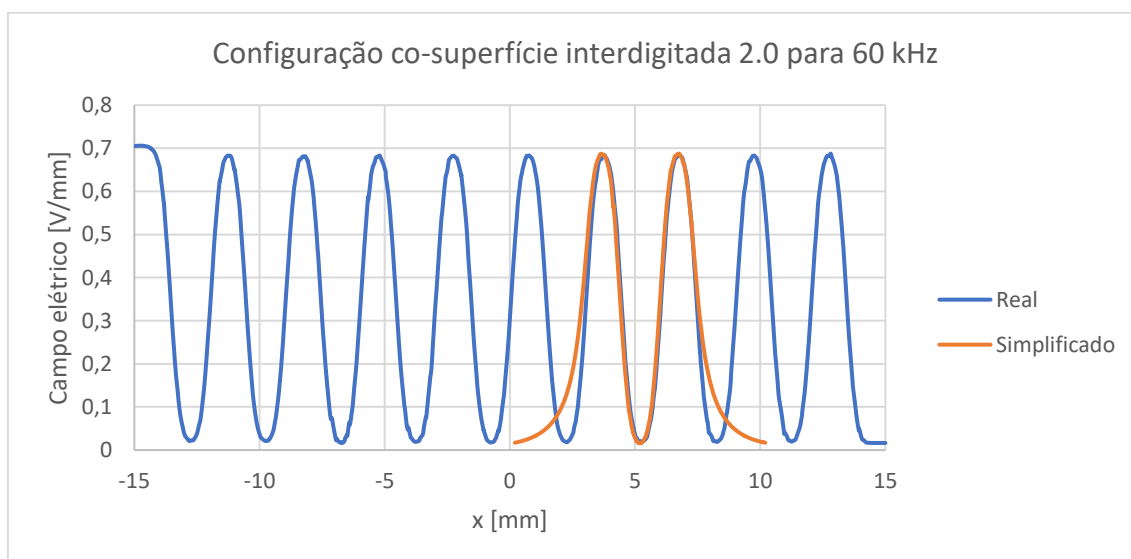


Figura 90 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície interdigitada 2.0.

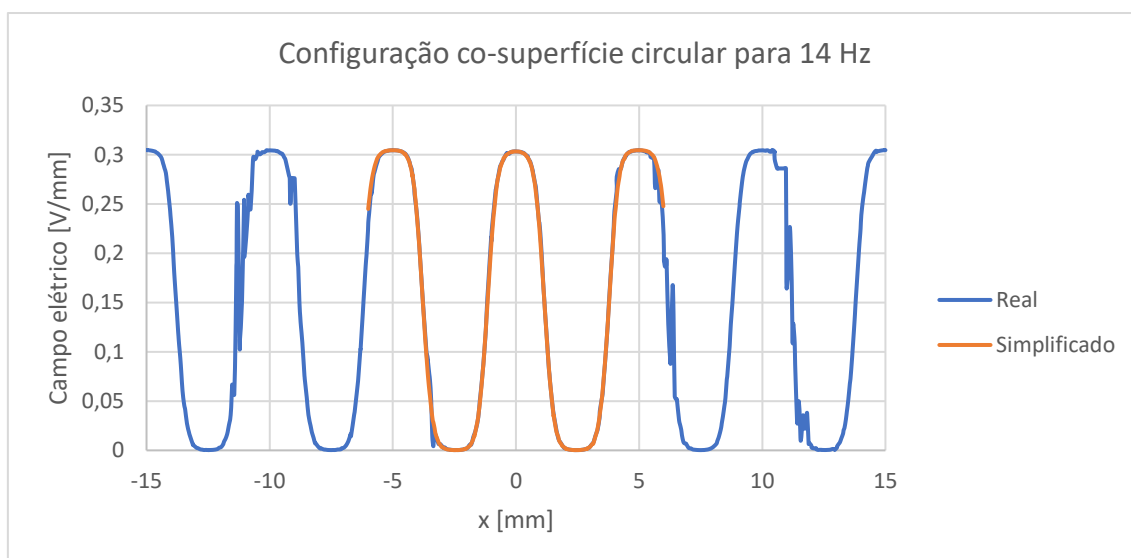


Figura 91 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular.

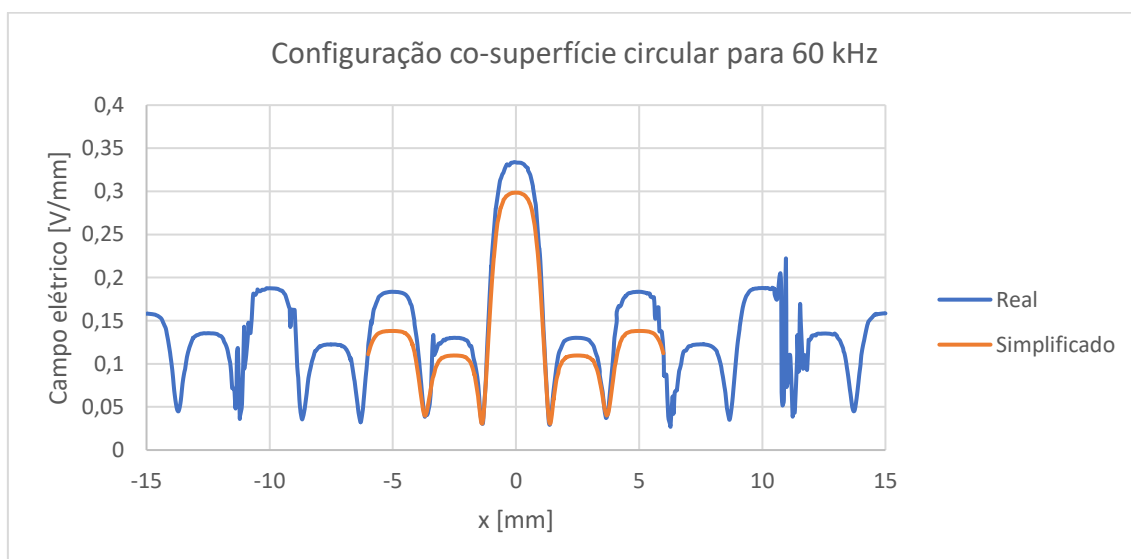


Figura 92 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular.

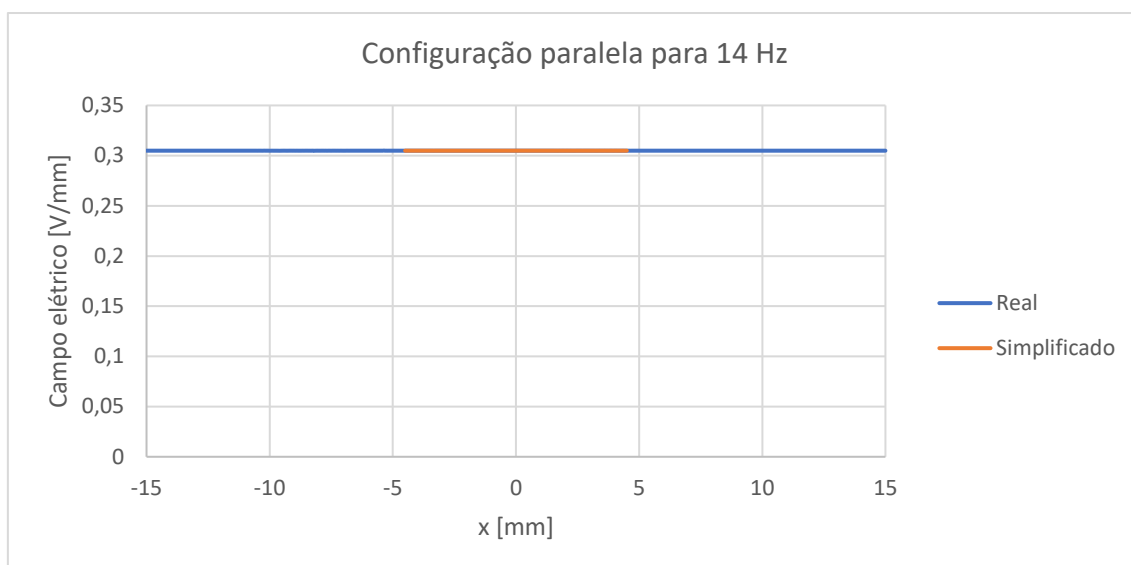


Figura 93 - Comparação do CE para BF no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração paralela.

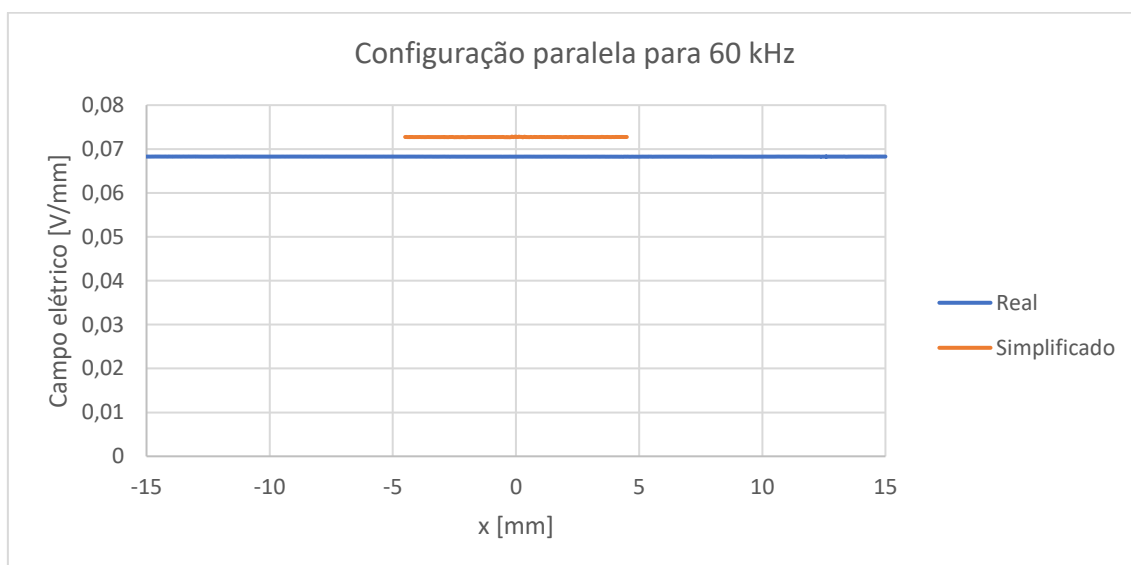


Figura 94 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração paralela.

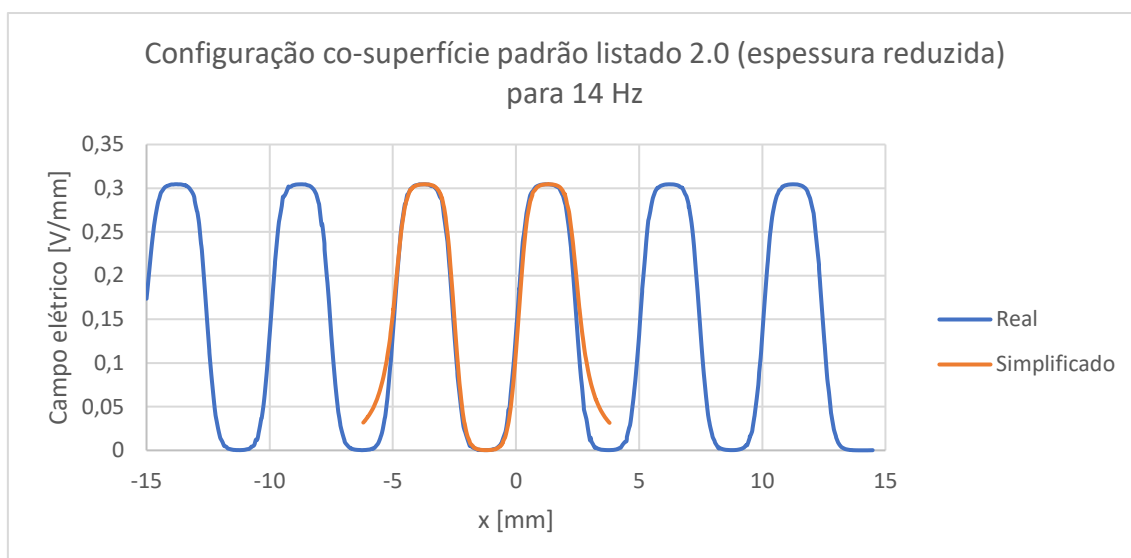


Figura 95 - Comparação do CE para 14 Hz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície padrão listado 2.0 (espessura reduzida).

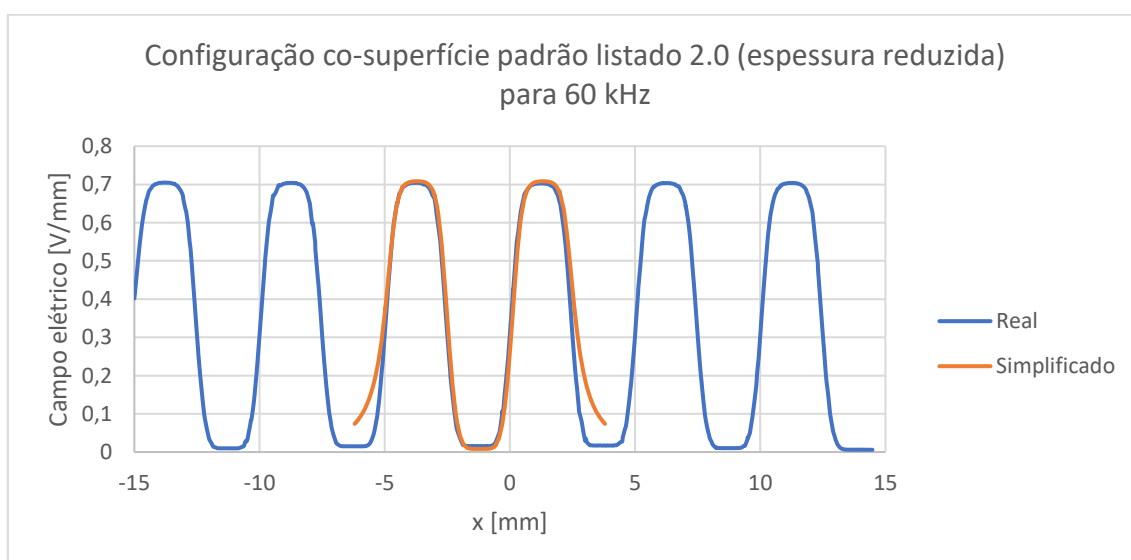


Figura 96 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície padrão listado 2.0 (espessura reduzida).

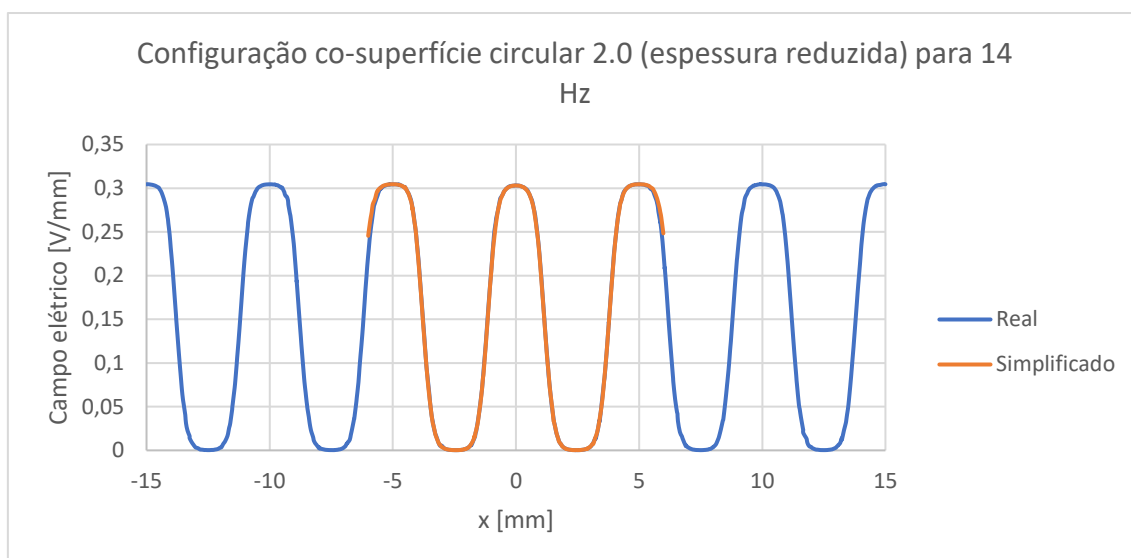


Figura 97 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular 2.0 (espessura reduzida).

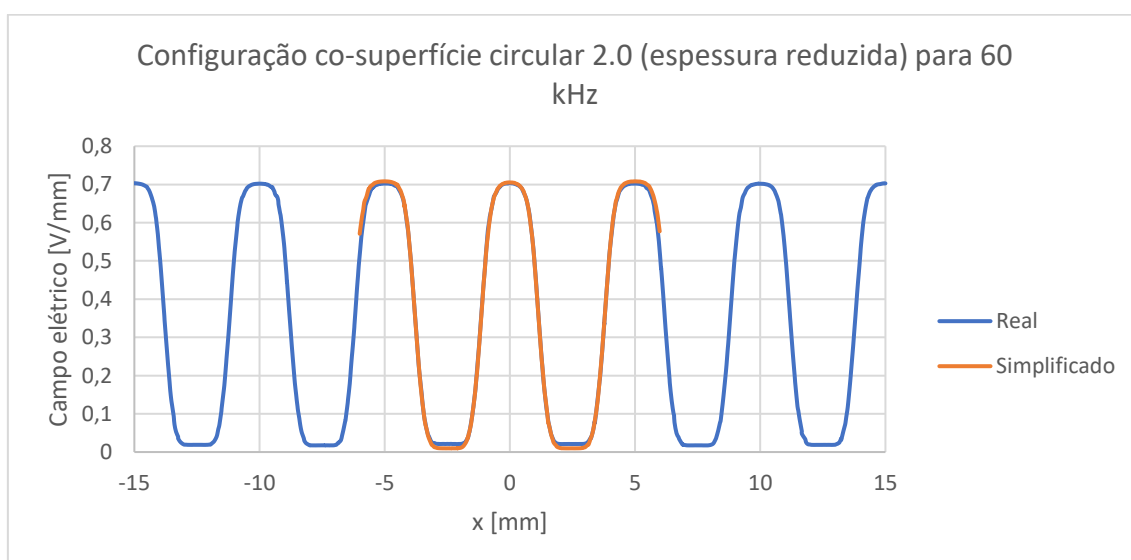


Figura 98 - Comparação do CE para 60 kHz no meio celular ($x=[-15\ 15]$ mm, $y=0$ mm, $z=0,51$ mm) entre o modelo simplificado e o modelo completo da configuração em co-superfície circular 2.0 (espessura reduzida).